

SÉRIE A, N° 936

N° D'ORDRE

1759

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M^{me} Y. KHOUVINE

1^{re} THÈSE. — DIGESTION DE LA CELLULOSE PAR LA FLORE INTESTINALE DE L'HOMME. *B. cellulosa dissolvens*, n. sp.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 6 Juin 1923 devant la Commission d'Examen.

MM. G. BERTRAND . . .	Président.
GENTIL	} Examinateurs.
COMBES	

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

1, RUE CASSETTE, 1

1923

SÉRIE A, N° 936

N° D'ORDRE

1759

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M^{me} Y. KHOUVINE

1^{re} THÈSE. — DIGESTION DE LA CELLULOSE PAR LA FLORE INTESTINALE DE L'HOMME. *B. cellulosa dissolvens*, n. sp.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 6 Juin 1923 devant la Commission d'Examen.

MM. G. BERTRAND. *Président.*

GENTIL } *Eraminateurs.*
COMBES. }

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

1, RUE CASSETTE, 1

1923

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen MOLLIARD, *Profess.* Physiologie végétale.

Doyen honoraire . . . P. APPELL.

Professeurs honoraires. { P. PUISEUX.
VELAIN.
BOUSSINESQ.
PRUVOT.

	E. PICARD.	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
	KOENIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	GOUSAT.	Calcul différentiel et calcul intégral.
	HALLER	Chimie organique.
	JOANNIS	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET	Électrotechnique générale.
	WALLERANT. . . .	Minéralogie.
	ANDOYER	Astronomie.
	PAINLEVÉ	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
	HAUG.	Géologie.
	H. LE CHATELIER. .	Chimie générale.
	GABRIEL BERTRAND.	Chimie biologique.
	M ^{me} P. CURIE	Physique générale et radioactivité.
	CAULLERY	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
	C. CHABRIÉ	Chimie appliquée.
	G. URBAIN	Chimie minérale.
	ÉMILE BOREL.	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
	MARCHIS.	Aviation.
	JEAN PERRIN.	Chimie physique.
	ABRAHAM.	Physique.
	CARTAN	Mécanique rationnelle.
	CL. GUICHARD	Géométrie supérieure.
<i>Professeurs</i>	LAPICQUE	Physiologie.
	GENTIL.	Géographie physique.
	VESSIOT.	Théorie des groupes et calcul des variations.
	COTTON.	Physique générale.
	DRACH.	Application de l'analyse à la géométrie.
	C. FABRY	Physique.
	CHARLES PÉREZ. . . .	Zoologie.
	LÉON BERTRAND. . . .	Géologie appliquée et géologie régionale.
	DANGEARD.	Botanique.
	LESPIEAU.	Théories chimiques.
	LEDUC	Physique théorique et physique céleste.
	MONTEL	Mathématiques générales.
	MAURAIN.	Physique du globe.
	RABAUD	Biologie expérimentale.
	WINTREBERT	Anatomie et physiologie comparées.
	HÉROUARD.	Zoologie.
	RÉMY PERRIER. . . .	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	SAGNAC.	Physique théorique et Physique céleste.
	PORTIER.	Physiologie.
	BLAISE	Chimie organique.
	PÉCHARD	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	AUGER	Chimie analytique.
	M. GUICHARD.	Chimie minérale.
	GUILLET.	Physique.

Secrétaire DANIEL TOMBECK.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

INTRODUCTION

Depuis longtemps on sait que la cellulose ingérée disparaît en partie dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Dès 1855, Haubner avait montré que les bœufs en digèrent 60 p. 100 environ. Mais on ne savait s'il fallait chercher la cause de cette dissolution dans l'action des sucs intestinaux et stomacaux, voire même de la salive, ou dans celles des fermentations microbiennes. Ce n'est qu'au cours de ces dix dernières années qu'on a fait la preuve que les ferments digestifs n'agissent aucunement sur la cellulose dont les herbivores absorbent une quantité considérable et qu'on a fait la preuve aussi que leurs aliments ne contiennent pas de cellulase. Il ne restait donc après cela qu'une hypothèse qui fût plausible : la digestion par des micro-organismes.

L'étude de ces derniers dans la flore intestinale de l'homme et des animaux est loin d'être facile. Chaque fois qu'on a immergé de la cellulose dans des liquides provenant du tube digestif ou dans une solution contenant des matières fécales, elle se désagrégeait, mais on a presque toujours échoué lorsqu'on voulait isoler les espèces qui produisaient cette désagrégation.

A vrai dire, chez l'homme, on n'a même jamais réussi l'isolement de ces espèces et c'est pour combler cette lacune que, sur le conseil de M. le D^r M. Weinberg, nous nous sommes mise au travail avec le dessein de rechercher et, si faire se pouvait, d'isoler de la flore intestinale de l'homme normal les espèces microbiennes capables de digérer la cellulose pure.

Après beaucoup de tâtonnements et de longues recherches,

nous avons réussi à isoler un microbe anaérobie strict, le *Bacillus cellulose dissolvens*, n. sp., qui attaque la cellulose et qui n'attaque qu'elle.

*
* *

Avant de décrire cette espèce, nous ferons l'historique de la digestion de la cellulose chez l'homme et les animaux :

1° Nous exposerons les méthodes de dosages qui permettent d'affirmer que la quantité de cellulose contenue dans les fèces est inférieure à la quantité de cellulose ingérée ;

2° Nous parlerons des coefficients de digestibilité ;

3° Des facteurs qu'on a supposé influencer ou qui influent réellement sur la digestion ;

4° Nous dirons quelle est la valeur nutritive attribuée à la cellulose et nous étudierons en dernier lieu les causes de sa dissolution dans le tube digestif.

*
* *

Nous nous en voudrions de clore cette courte introduction sans exprimer nos remerciements les plus vifs à M. le Dr M. Weinberg qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire de l'Institut Pasteur où nous avons pu travailler dans les conditions les meilleures. Notre gratitude et nos remerciements vont aussi à M. le professeur G. Bertrand qui nous a, dans l'exécution de la partie chimique de ce travail, constamment aidée de ses conseils.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE DE LA DIGESTION DE LA CELLULOSE

CHAPITRE I

MÉTHODES DE DOSAGE DE LA CELLULOSE

A. Méthodes de dosage de la cellulose brute.

La membrane cellulaire des végétaux n'est pas de la cellulose pure, mais de la cellulose mélangée à des pentosanes, des gommes, de la vasculose, du lignol, de la cutose, etc.. Ces diverses matières incrustantes sont plus facilement attaquées que la cellulose par les alcalis, les acides faibles ou les oxydants peu énergiques. On appelle cellulose brute le résidu qu'on obtient après avoir fait agir certains de ces réactifs sur les aliments ou les matières fécales dans lesquels on cherche à doser la cellulose. Ce n'est pas un corps défini, mais un mélange qui est fonction de la méthode et des substances employées. La cellulose pure, répondant à la formule $(C^6H^{10}O^5)_n$, a la composition élémentaire suivante :

Carbone	44,4 p. 100
Hydrogène	6,2 —
Oxygène	49,4 —

et la cellulose brute de Henneberg et Stohmann, par exemple, donne à l'analyse :

CELLULOSE BRUTE DE	CARBONE p. 100	HYDROGÈNE p. 100	OXYGÈNE p. 100
Paille de froment	46,5	6,3	48,3
Fèces de paille de froment	48,1	6,8	45,1
Foin des prairies.	46,6	6,8	46,7
Fèces de foin des prairies.	50,7	7,1	42,2
Trèfle	48,4	7	44,6
Fèces de trèfle	51,3	6,7	42

On voit que la cellulose brute n'a pas une composition fixe et qu'elle est plus riche en carbone que la cellulose pure. Ce fait s'explique par la teneur plus élevée en carbone de la cutose (73,7 p. 100), de la vasculose (59,3 p. 100) et du lignol (61,9 p. 100) qui sont mélangés à la cellulose en proportions variables.

Pour doser cette cellulose brute, il y a plusieurs méthodes dont la plus ancienne est celle de Henneberg et Stohmann [54] ou méthode de Weende. On met 3 grammes de substance sèche, pulvérisée, épuisée par l'éther, s'il y a lieu, dans une capsule de platine avec 200 cent. cubes d'acide sulfurique à 1,25 p. 100. On fait bouillir pendant une demi-heure, en ayant soin de remplacer l'eau d'évaporation. On laisse refroidir. La matière se dépose. On décante le liquide avec précaution à l'aide d'un siphon. On lave à deux reprises le résidu en le faisant bouillir avec 200 cent. cubes d'eau. Tous les liquides décantés sont réunis afin de laisser déposer les particules entraînées. Le résidu resté dans la capsule est alors additionné de 200 cent. cubes de lessive de potasse à 1,25 p. 100. On fait bouillir une demi-heure en se conformant à ce qui a été dit plus haut. On lave deux fois avec 200 cent. cubes d'eau et les liqueurs alcalines sont mises de côté. Le résidu est recueilli sur un filtre taré. On y ajoute le dépôt des eaux alcalines et, après lavage, le dépôt des eaux acides. On lave ensuite avec de l'eau, de l'alcool et de l'éther. Après dessiccation à 100°, on pèse. Le poids des cendres est déterminé après calcination, et la quantité de cellulose brute contenue dans la prise d'essai est la différence entre les deux pesées.

Telle est la méthode de Weende dans sa forme primitive. Elle a été souvent modifiée. Hellriegel et Lukanus [51] font bouillir les substances pendant deux heures avec une solution d'acide à 1 p. 100, puis pendant une demi-heure avec une

solution d'alcali à 4 p. 100. V. Hofmeister [56] commence par un épuisement à l'éther et à l'alcool bouillants, puis il fait une digestion de deux heures à 80° avec une lessive de potasse à 3 p. 100. Il termine en faisant bouillir avec de l'acide acétique concentré afin de diminuer la quantité d'azote contenu dans la cellulose brute. Kühn [86] considère que les réactifs employés par V. Hofmeister sont trop énergiques. Von Knirriem [79], lorsqu'il analyse des têtes de poulet, remplace l'acide sulfurique par de l'acide chlorhydrique. Sur des fèces de chien, il fait agir d'abord de la lessive de soude à 1,25 p. 100, puis de l'acide sulfurique à 1,25 p. 100 et enfin de la lessive de potasse. Grandeau [39] conseille, lui aussi, l'emploi de l'acide chlorhydrique qui donne d'excellents résultats, dit-il, et fournit une cellulose plus pure. Wicke [174] traite 8 à 10 grammes de substance sèche par 300 cent. cubes d'acide sulfurique à 2,5 p. 100, puis par 300 cent. cubes de lessive de soude à 2,5 p. 100, en ayant soin de laver deux fois après chaque traitement et de terminer par des lavages à l'alcool et à l'éther. O. Sweeny [153] neutralise la liqueur acide avec une lessive de soude à 10 p. 100, puis ajoute 200 cent. cubes de solution de soude à 2,65 p. 100. Cornelia Kennedy [153], sans neutralisation préalable, verse 200 cent. cubes de lessive de soude à 9,25 p. 100 et conseille de laver le résidu du traitement alcalin à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 1,25 p. 100 pour redissoudre le précipité qui s'est formé par la neutralisation de la liqueur acide. E. B. Forbes et J. E. Menschig [34] neutralisent en présence de phtaléine, ajoutent 200 cent. cubes de lessive de soude à 2,65 p. 100 et terminent par un lavage à l'acide chlorhydrique. Dmochowski et Tollens [27] soumettent durant une heure à 80° le résidu obtenu par la méthode de Weende, à l'action de 25 à 40 cent. cubes d'acide azotique de densité 1,15. Nous citerons encore la modification apportée par Kalning [71] : après le traitement par l'acide à 1,25 p. 100, il fait bouillir pendant dix minutes avec de la lessive de soude concentrée.

Nous donnerons maintenant un résumé des changements apportés à la méthode de Weende en vue de la rendre plus rapide. Son plus grand défaut est, en effet, la longue durée de chaque opération. Il faut laisser déposer les substances environ douze heures avant de pouvoir décantier les liquides qui

surnagent. Comme il y a six décantations, trois jours sont nécessaires pour doser la cellulose brute. Holdefleiss [61] opère les décoctions et les filtrations successives dans une poire en verre, fermée à sa partie inférieure par un tampon-filtre en asbeste. Le chauffage se fait dans la poire même par injections de vapeur et on filtre en aspirant les liquides à l'aide d'une trompe. H. Wattenberg [164] emploie des capsules de porcelaine dont un filet bleu circulaire délimite un volume de 200 cent. cubes, ce qui rend très aisé le maintien d'un volume constant. Pour filtrer, il se sert d'un entonnoir recouvert de gaze et de papier filtre qu'il met en relation avec un aspirateur de Bun-sen. L. Grandeau [39] recommande d'employer le filtre-siphon de E. Bartmann, entonnoir sur lequel on attache une toile fine et qu'on plonge dans les liquides à filtrer; ces derniers sont soutirés par aspiration. Ce mode de filtration très rapide a été employé, légèrement modifié, par H. Holldack [63], W. Iwanowski [70], J. M. Pickell [128] et J. Schröder [144]. Stift [151] a utilisé aussi la poire de Holdefleiss, mais en la divisant en deux parties : la poire elle-même et le filtre qui sont réunis par un joint rodé. Grégoire et Carpiaux [41] adaptent cette poire à un creuset de Gooch de grand modèle; le creuset est fixé sur un entonnoir dont l'extrémité est munie d'un tube de caoutchouc d'environ 50 centimètres qui est relevé pendant les opérations. Le filtre est constitué par un lit d'environ 1 centimètre d'asbeste à longues fibres reposant sur une mince couche de fragments de quartz; on le maintient dans le fond du creuset par une baguette de verre dont l'extrémité est aplatie. Pour faire fonctionner le filtre, il suffit d'abaisser le tube de caoutchouc; la filtration et les lavages se font ainsi rapidement. L. Lindet [94] propose de bloquer les résidus cellulosiques dans une gelée d'alumine, puis de les filtrer sur du papier. R. Fanto et W. Nikolitsch [33] versent le liquide et le résidu dans une cartouche à extraction munie de deux œillets dans lesquels on peut passer une tige de verre. Quand le liquide est écoulé, ils plongent la cartouche dans un gobelet de verre plein d'eau; l'eau passant de l'extérieur à l'intérieur décolmate le filtre qui laisse ensuite écouler facilement son contenu. Suivant la méthode officielle adoptée aux États-Unis [112], les premières filtrations doivent être faites à travers une toile fine, tandis que la dernière se fait à l'aide d'un

creuset de Gooch. G. Bidwell [44] conseille d'ajouter de l'amiante avant de filtrer à travers la toile pour éviter de perdre les particules les plus fines. Forbes et Mensching [34], Dmochowski et Tollens [27] se servent du creuset de Gooch pour toutes les filtrations; G. M. Nider [120], W. Greifenhagen [42], Mach et Lederle [100] ont préconisé, pour opérer rapidement, l'emploi de filtres spéciaux qui résistent au vide. Von Kniriem [79] avait conseillé de centrifuger avant de décantier, et F. C. Gephart [37] fait les décoctions dans des tubes à centrifuger en silice, évitant de la sorte tout transvasement.

Nous citerons encore les modifications de G. M. Nider [120], de H. P. Sy [154], de G. Bidwell [44] qui, pour éviter la mousse, font passer un courant d'air à la surface des liquides en ébullition. Howell Spears [147], Bidwell [44] et les expérimentateurs qui se servent de la méthode officielle américaine emploient un réfrigérant ascendant pour condenser l'eau d'évaporation.

Tous les changements que nous avons décrits ne sont pas des améliorations de la méthode de Henneberg et Stohmann. On ne peut guère recommander que l'emploi des capsules de Wattenberg, des réfrigérants ascendants et quelques procédés de filtration rapide. Les différents réactifs proposés se révèlent trop énergiques. On emploie généralement aujourd'hui de l'acide sulfurique à 1,25 p. 100 et une lessive alcaline, également à 1,25 p. 100. A cette faible concentration néanmoins, ils dissolvent une certaine quantité de cellulose, qu'elle soit pure ou brute. Kern [76] et W. Hofmeister [55] font remarquer que le papier filtre suédois, traité par la méthode de Henneberg et Stohmann, subit une perte de 8,6 p. 100. Bidwell et Walton [15] montrent que la quantité de cellulose brute obtenue avec un même aliment est inversement proportionnelle à la concentration des réactifs. Pour A.-J.-J. Vandeveldt [158] le changement de la concentration de l'acide influe seul sur les résultats. Otto Nolte [124], comme Bidwell et Walton [15], dit qu'en augmentant la concentration des réactifs on diminue le poids du résidu cellulosique. De plus il établit que la composition centésimale de la cellulose brute ne varie pas, même quand on emploie des réactifs à faible concentration. L'acide et la lessive alcaline à 1,25 p. 100 en dissolvent par conséquent une certaine

quantité. Il étudie aussi l'influence, sur le poids du résidu de cellulose, du degré de pulvérisation des substances en recommençant les premières expériences de Henneberg et Stohmann. Ces auteurs avaient indiqué qu'on obtient 35,8 p. 100 de cellulose brute avec du foin coupé aux ciseaux et 33,2 p. 100 avec le même foin pulvérisé au moulin. Otto Nolte [121] montre que la quantité de cellulose brute diminue quand on augmente le degré de pulvérisation de substances dures comme les balles d'avoine, d'orge ou les téguments de sarrasin, mais qu'elle ne change pas quand on opère sur des substances tendres (foin) plus ou moins finement pulvérisées. On a du reste conseillé, pour que les résultats obtenus soient comparables, de faire passer les poudres à travers un tamis dont les mailles ont 1 millimètre de diamètre.

A côté de la méthode de Weende et de ses modifications, nous trouvons celle de Lebbin citée par K. B. Lehmann [92]. On prend 3 grammes de substance sèche, pulvérisée, qu'on fait bouillir une demi-heure avec de l'eau, puis on ajoute 50 cent. cubes d'eau oxygénée à 20 p. 100 et on maintient l'ébullition pendant vingt minutes en ajoutant par petites quantités (1 cent. cube) 15 cent. cubes de solution d'ammoniaque à 5 p. 100.

Nous citerons encore la méthode de J. König [82]. On prend 3 grammes de substance sèche, 200 cent. cubes de glycérine et 4 grammes d'acide sulfurique concentré. Le mélange est maintenu, soit une heure à 133-135° dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant, soit une heure dans l'autoclave à la pression de 3 atmosphères. Après refroidissement, on dilue à 400-500 cent. cubes, on porte à l'ébullition et on filtre le liquide encore chaud à l'aide d'un creuset de Gooch. Le résidu est lavé avec 400 cent. cubes d'eau bouillante, puis avec de l'alcool chaud et enfin avec un mélange d'alcool et d'éther chauds jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. On le sèche à 100-105° et on le pèse. Par incinération on détermine le poids des cendres, et la différence entre les deux pesées donne le poids de cellulose brute.

Ces deux dernières méthodes ayant peu servi à déterminer des coefficients de digestibilité de la cellulose chez l'homme ou les animaux, nous nous trouvons donc en présence d'une seule méthode, celle de Weende plus ou moins modifiée. Les résultats qu'elle donne sont tout à fait satisfaisants et suffisent

pour l'agronomie, mais il ne faut pas perdre de vue que les matières albuminoïdes ne sont pas entièrement dissoutes et que les résultats peuvent être faussés, au point qu'on trouve dans les fèces plus de cellulose que n'en contenaient les aliments. K. Mann [102], qui a étudié la dissolution de l'élastine par la méthode de Weende, conseille de corriger les résultats obtenus en faisant un dosage d'azote dans le résidu. L.-D. Haigh [46] recommande de faire digérer par de la pepsine les substances riches en azote avant de les soumettre à l'action de l'acide et de la lessive alcaline.

B. Méthodes de dosage de la cellulose pure.

A côté des méthodes qui ne donnent qu'une cellulose impure, nous en trouvons qui permettent d'obtenir de la cellulose pure. Nous n'exposerons que celles qui ont été employées dans des essais de digestion, laissant de côté, systématiquement, celles qui ne sont en usage que dans l'industrie.

Nous donnerons d'abord la méthode de Schulze [145] qui a un gros intérêt historique, puisque c'est, en date, la première méthode au chlore. On commence par épuiser la matière par l'eau, par l'alcool et par l'éther. On dessèche le résidu, on le réduit en poudre, puis on le soumet à l'action de l'acide nitrique et du chlorate de potassium de la manière suivante :

Dans un flacon bien bouché, on fait macérer pendant douze à quinze jours 2 à 4 grammes de substance dans 12 parties en poids d'acide nitrique de densité 1,10 additionné de 0,8 partie en poids de chlorate de potassium. La température de la pièce dans laquelle on opère ne doit pas dépasser 15°. Puis on ajoute un peu d'eau, et on filtre; on lave le résidu d'abord à l'eau froide, ensuite à l'eau chaude. On fait tomber le contenu du filtre dans un verre de montre et on le laisse digérer à 60° pendant trois quarts d'heure environ avec de l'eau ammoniacale au cinquième. On rassemble le résidu sur un filtre taré, on le lave avec la même solution ammoniacale froide jusqu'à ce que le liquide passe entièrement incolore, puis on le lave à l'eau froide, à l'eau chaude, à l'alcool et à l'éther.

Schulze recommande tout particulièrement d'éviter que la température dépasse 15° pendant la macération, de peur

qu'une oxydation énergique ne se produise et n'amène des explosions.

Kühn, Aronstein et H. Schulze [86] disent que cette méthode donne de la cellulose pure; Stohmann [152] n'a pu, en l'employant, obtenir de bons résultats, et König [81] a tellement purifié la cellulose par l'emploi de l'eau de chlore et des hypochlorites qu'il a eu des résultats négatifs.

Von Kniriem [79], avec la méthode de Schulze, obtient à peu près les mêmes résultats qu'avec la méthode de Henneberg et Stohmann. Du papier filtre et des fèces de lapin traités par la méthode de Henneberg et Stohmann lui ont donné respectivement 89,13 p. 100 et 31,33 p. 100 de cellulose brute, et traités par la méthode de Schulze, 90,70 p. 100 et 32,54 p. 100 de cellulose pure.

W. Hofmeister [55] dit que la cellulose de Schulze est peut-être plus pure que celle de Henneberg et Stohmann, mais que les résultats obtenus par la méthode de Schulze sont variables, et que les réactifs employés sont trop faibles pour donner de la cellulose pure et trop forts pour donner de la cellulose brute.

Nous exposerons maintenant la méthode de W. Hofmeister [55] qu'on a fréquemment employée dans des essais de digestion. On pulvérise les substances très finement et, s'il le faut, on les dégraisse. On ajoute 6 parties d'acide chlorhydrique de poids spécifique 1,03 et au besoin une plus grande quantité pour que les substances, quel que soit leur volume, baignent toujours entièrement dans l'acide. Après avoir mélangé avec soin, on sature avec du chlorate de potassium et on abandonne, dans un récipient fermé, à la température du laboratoire, en agitant de temps à autre. En général, la réaction est terminée au bout de vingt-quatre heures; les substances sont alors de couleur jaune clair. On étend d'eau le mélange, on filtre, on lave le résidu à l'eau froide, à l'eau chaude, on le sèche et on le pèse. W. Hofmeister, en traitant par de la lessive de soude à 5 p. 100 pendant vingt-quatre heures à la température du laboratoire la cellulose ainsi obtenue, a pu en dissoudre une certaine quantité qu'il a appelée cellulose pure soluble. Le résidu, c'est la cellulose pure insoluble, et le mélange des deux celluloses est désigné sous le nom de « *rohcellulose* ».

Nous citerons encore la méthode au chlore de Cross et

Bevan [22]. Après avoir fait bouillir les substances avec de l'alcool, puis avec de la lessive de soude diluée, on les met en contact avec du chlore gazeux. On fait trois chlorurations de vingt minutes chacune, en ayant soin de placer les récipients dans l'eau glacée. On ajoute, pour chasser l'excès de chlore, une solution d'acide sulfurique qu'on laisse agir pendant une demi-heure. On filtre et on lave le résidu. On le fait bouillir pendant deux heures au bain-marie avec une solution de sulfite de soude à 2 p. 100. On filtre à travers un creuset de Gooch, on lave à l'eau chaude. On ajoute dans le creuset une solution de permanganate de potassium à 1 p. 100, on la soutire après cinq minutes de contact et on lave le résidu avec de l'acide sulfurique dilué pour enlever le bioxyde de manganèse qui s'est formé. On termine par des lavages à l'eau chaude, on sèche et on pèse. Le poids des cendres est donné par incinération.

Simon et Lohrisch [146] ont indiqué une méthode rapide de dosage de la cellulose pure qui repose sur le fait déjà cité par Lange [89] et Hoppe-Seyler [64 *bis*] que les substances incrustantes sont décomposées par les alcalis en fusion, tandis que la cellulose est dissoute, mais non détruite. Ce qui en a été dissous est précipité par l'alcool. Simon et Lohrisch opèrent sur 5 grammes de fèces, sur 2 à 3 grammes de plantes desséchées et pulvérisées, ou bien sur 5 grammes de plantes fraîches. Il est inutile de commencer par extraire les matières grasses, mais il faut se débarrasser de l'amidon en le faisant digérer par la diastase. On place ces substances avec 100 cent. cubes d'eau dans un gobelet de verre de 500 cent. cubes; on mélange avec soin en évitant de laisser de gros morceaux. On ajoute une quantité suffisante de potasse en plaque pour faire une lessive à 50 p. 100; par sa fusion, la température du mélange s'élève et les matières incrustantes sont attaquées. Quand toute la potasse est dissoute, on fait bouillir pendant une heure au bain-marie. On laisse refroidir; on ajoute goutte à goutte 3 à 5 cent. cubes d'eau oxygénée à 30 p. 100 (Merck), et pour faire tomber la mousse abondante qui se produit on verse quelques centimètres cubes d'alcool à 96°. L'addition d'eau oxygénée détermine un nouvel échauffement; toutes les substances organiques sont détruites, excepté la cellulose. Si on voit dans la masse quelques morceaux non attaqués, on reporte le gobelet de verre

au bain-marie, où on le laisse trente à quarante-cinq minutes. Après refroidissement on ajoute au mélange la moitié de son volume d'alcool à 96°. Il arrive que l'alcool surnage comme de l'huile sur de l'eau. Pour éviter cet inconvénient il suffit de verser 5 à 7 cent. cubes d'acide acétique concentré. La cellulose précipite finement, et les matières protéiques restent en dissolution dans le liquide qui est encore très alcalin. On le filtre chaud sur un filtre dur (Schleicher et Schüll n° 275, diamètre 24 centimètres). Le résidu est composé de cellulose pure soluble et de cellulose pure insoluble qu'on lave une ou deux fois à l'eau chaude pour enlever l'excès d'alcali. On le remet dans un verre plein d'eau chaude, on filtre sur un filtre taré (Schleicher et Schüll n° 589, diamètre 12 c. 5). On lave à l'eau chaude jusqu'à disparition de l'alcalinité, à l'acide acétique dilué pour dissoudre les sels inorganiques et enfin à l'eau, à l'alcool et à l'éther. On sèche et on pèse.

Les auteurs font remarquer que la quantité de cellulose qui se dissout pendant l'ébullition avec la lessive de potasse et l'eau oxygénée varie avec la nature des substances traitées. C'est ainsi que la cellulose de pomme de terre se dissout presque entièrement, celle de froment très peu, celle de papier ou de ouate moins encore. La cellulose qu'ils ont obtenue est semblable, disent-ils, à celle que donne la méthode de W. Hofmeister [55], et la leur a l'avantage d'être très courte, puisque, en cinq heures, on peut faire un dosage. Le contenu en azote de la cellulose ne dépasse pas 1 p. 100 et le poids des cendres est faible avec du pain, des légumes, etc..., mais la cellulose des fèces contenant beaucoup de cendres, il sied d'en déterminer le poids.

Pour W. Grimmer et A. Scheunert [43] ainsi que pour A. Scheunert et E. Lötsch [140], les résultats que donne cette méthode sont erronés, car on détruit une grande quantité de cellulose par l'ébullition avec la potasse et l'eau oxygénée. Ils ont trouvé que le papier filtre suédois perd plus de 30 p. 100 de son poids après avoir été traité suivant les indications de Simon et Lohrisch [146], tandis que ces auteurs indiquent une perte ne dépassant pas 10 p. 100.

Nous donnerons maintenant le procédé par lequel J. König [82] obtient de la cellulose pure en partant de la cellulose brute, résidu du traitement par l'acide sulfurique et la glycé-

rine. Il oxyde la lignine (1) par l'eau oxygénée et l'ammoniaque; le résidu est traité par l'oxyde de cuivre ammoniacal qui ne dissout que la cellulose. La partie insoluble est recueillie et pesée, c'est la cutose. La cellulose en solution dans le réactif de Schweitzer est précipitée par de l'alcool à 80°. Le poids de lignine est la différence entre le poids de cellulose brute d'une part et celui de cellulose pure et de cutose d'autre part

Nous en avons terminé avec l'exposé des méthodes de dosage qui ont été employées dans des essais de digestion. Nous ferons simplement remarquer que, pour une même substance, elles donnent des quantités différentes de cellulose brute ou de cellulose pure, et qu'une partie plus ou moins importante de ces celluloses est dissoute. Les coefficients de digestibilité obtenus à l'aide de ces méthodes n'ayant pas une valeur absolue, nous indiquerons dans les essais de digestion que nous allons résumer quelle a été la méthode employée pour les établir.

(1) La lignine des auteurs allemands est un mélange dans lequel on trouve surtout de la vasculose et du lignol.

CHAPITRE II

ESSAIS DE DIGESTION

A. Essais de digestion faits sur l'homme.

Les premiers essais qui permettent de conclure que la cellulose est digérée par l'homme sont ceux de Weiske [167]. Avant de mettre un individu à un régime végétarien, il lui donne pendant trois jours des aliments carnés pour débarrasser son tube digestif de tout reste végétal. Puis il lui donne des carottes et des choux cuits à l'eau et du céleri en salade. Les fèces sont recueillies depuis le premier jour de régime végétarien jusqu'au quatrième jour après cessation de ce régime, pour éviter les pertes de cellulose. Les déterminations de cellulose sont faites dans les aliments et dans les fèces d'après la méthode de Weende.

Voici les résultats de Weiske, résumés dans les tableaux suivants.

Essai fait sur W...

DATE	NATURE DES ALIMENTS	POIDS des aliments desséchés en grammes	CONTENU en cellulose brute		COEFFICIENT de digestibilité p. 100
			aliments en gr.	fèces en gr.	
16, 17, 18 décembre.	Œufs, viande, beurre.	»	»	»	»
19 décembre . . .	Carotte.	145,58	11,843	16,407	»
— . . .	Céleri.	37,18	3,171		
20 décembre . . .	Choux.	63,08	6,364		
— . . .	Céleri.	37,18	3,171		
21 décembre . . .	Choux.	31,83	3,214		
— . . .	Céleri.	38,54	3,297		
22, 23, 24 décembre.	Œufs, viande, beurre.	»	»	0,265	»
Total		353,39	31,057	16,372	47,3

Essai fait sur S...

DATE	NATURE DES ALIMENTS	POIDS des aliments desséchés en grammes	CONTENU en cellulose brute		COEFFICIENT de digestibilité p. 100
			aliments en gr.	féces en gr.	
16, 17, 18 décembre.	Œufs, viande, beurre.	»	»	»	»
19 décembre . . .	Carotte.	145,58	11,843	13,332	»
— . . .	Céleri.	37,18	3,171		
20 décembre . . .	Choux.	63,08	6,364		
— . . .	Céleri.	37,18	3,171		
21 décembre . . .	Choux.	95,49	9,634		
— . . .	Céleri.	38,54	3,297	0,631	»
22, 23, 24 décembre.	Œufs, viande, beurre.	»	»		
Total		516,73	37,846	13,963	62,7

Si W. digère moins bien la cellulose brute que S., c'est parce qu'il était habitué, dit Weiske, à une alimentation carnée, tandis que S. mangeait avec plaisir, le régime lui convenant bien. De plus, Weiske fait remarquer que la cellulose brute des fèces contient toujours plus de carbone que celle des aliments. et il en conclut que dans le mélange cellulose, lignine et cutose, c'est surtout la cellulose qui est digérée.

Von Kniriem [49] a recommencé les expériences de Weiske

DATE	NATURE DES ALIMENTS	CONTENU en cellulose brute		COEFFICIENT de digestibilité p. 100
		aliments en gr.	féces en gr.	
2 au 10 mai .	Lait, viande, fromage, café filtré, bière.	»	»	»
11 mai . . .	Mêmes aliments + 37 grammes de <i>Scorzonera hispanica</i> .	3,3675	3,2196	0
12 au 18 mai .	Lait, viande, fromage, café, bière.	»	»	»
19 mai . . .	Mêmes aliments + 240 grammes de <i>Lactuca sativa</i> .	0,978	0,9433	»
20 mai . . .	Lait, viande, fromage, café, bière + 70 grammes de <i>Lactuca sativa</i> .	0,285	»	23,32
21 au 27 mai .	Lait, viande, fromage, café, bière.	»	»	»

avec des racines de *Scorzonera hispanica* cuites à l'eau et des cœurs de *Lactuca sativa* qu'il mélange à une nourriture carnée

composée de lait, de viande et de fromage. La période de pré-alimentation est beaucoup plus longue que dans les essais de Weiske; elle dure neuf jours, tandis que l'essai proprement dit est beaucoup plus court (un jour ou deux). La cellulose brute a été dosée dans les aliments et dans les fèces par la méthode de Henneberg et Stohmann. Les résultats que nous résumons dans le tableau ci-dessus sont bien inférieurs à ceux de Weiske. Ils montrent que la cellulose dure est moins facilement digérée que la cellulose tendre.

H. Wicke, Rubner et Wicke [176] montrent, eux aussi, que la cellulose dure est moins facilement digérée que la cellulose tendre. Ils se servent de pain de seigle, fait soit avec des grains entiers soit avec des grains décortiqués. — K. Mann [402], dans ses essais sur la dissolution de l'élastine par la méthode de Weende, trouve qu'environ 50 p. 100 de la cellulose ingérée disparaît. — R. Bárány [7] étudie la digestion de pain additionné de cellulose par un végétarien et un omnivore.

Tous ces auteurs ont fait leurs dosages avec la méthode de Weende. Les résultats qu'ils ont obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

NOM D'AUTEUR	NOMBRE d'essais	NUMÉRO de jours d'essais	NATURE DES ALIMENTS	CONTENU de cellulose		COEFFICIENT de digestibilité p. 100
				aliments en gr.	fèces en gr.	
Wicke [176]	1	3	Pain de seigle décortiqué.	20,24	14,72	27,3
—	2	3	Pain de seigle non décortiqué.	27,9	23,9	7,1
Rubner et Wicke [176]	1	»	Pain n° 1.	0,59	0,3	49,2
	2	»	Pain n° 2 contenant plus de cellulose.	2,04	0,96	53
	3	»	Pain n° 3 contenant beaucoup de cellulose.	8,27	7,96	4,4
Mann [402]	4	»	Pain d'orge fin.	»	»	env. 50
Bárány [7]	1 (végétarien).	4	Pain à 3 ou 4 p. 100 de cellulose.	137,7	81	41,4
—	2 (omnivore).	4	Pain à 3 ou 4 p. 100 de cellulose.	96,4	72,2	25,9

Ces essais nous permettent de conclure que la cellulose brute est digérée par l'homme.

Les premières expériences faites avec des méthodes de dosage de cellulose pure sont celles de W. Hofmeister qui a essayé sur lui-même [55] l'utilisation de sa « *rohcellulose* » et de sa cellulose pure soluble. Il a constaté qu'il digère 5,6 p. 100 de la première et 75,7 p. 100 de la seconde.

Nous trouvons ensuite les essais de H. Lohriscch [96] qui dose la cellulose par la méthode de Simon-Lohriscch. Il détermine d'abord l'utilisation de la cellulose de pomme de terre chez des individus mis au régime diététique de Schmidt et Strassburger (1). Ce régime, il le change en ajoutant des quantités variables de cellulose sous forme de jeunes légumes.

Voici ses résultats qui prouvent qu'un grand pourcentage de cellulose est digérée par l'homme normal.

NUMÉRO	NOM ET SEXE	NUMÉRO de jours d'essai	NATURE DES ALIMENTS	CONTENU en cellulose pure		COEFFICIENT de digestibilité p. 100
				aliments en gr.	féces en gr.	
2	Femme Ho...	1	Diète d'essai.	0,8916	0,4947	44,5
3	—	1	Diète d'essai + chou blanc.	2,8591	0,3514	87,7
4	—	1	Diète d'essai + chou rave.	3,0756	0,95	69,2
5	—	1	Diète d'essai + épinards.	1,9836	0,59	70,3
6	—	1	Diète d'essai + pain.	1,8666	9,6080	67,4
7	—	1	Diète d'essai + lentilles.	4,9576	2,608	47,4
8	Homme J...	1	Diète d'essai.	0,8916	0,4531	49,2
9	—	2	Diète d'essai + chou blanc.	5,1132	0,936	84,7
10	Homme G...	1	Diète d'essai.	0,8916	0,327	63,4
	—	1	Diète d'essai + carottes.	2,7491	0,3318	87,8

Une autre série d'essais a été faite en remplaçant la purée de pomme de terre de la diète par des légumes et en supprimant les biscottes. Ici encore la cellulose est bien digérée,

(1) Régime de Schmidt et Strassburger :

Le matin : un demi-litre de lait et 50 grammes de biscottes.

Dans la matinée : un demi-litre de bouillie de gruau d'avoine composée de 40 grammes de gruau, 10 grammes de beurre, 200 grammes de lait, 300 grammes d'eau, un œuf, et du sel à volonté.

A midi : 25 grammes de viande de bœuf hachée, pesée crue. La cuire à la surface avec 20 grammes de beurre, de façon que le centre reste cru, 250 grammes de purée de pommes de terre passées au tamis fin, 100 grammes de lait, 10 grammes de beurre avec un peu de sel.

L'après-midi : comme le matin.

Le soir : comme dans la matinée.

mieux même que dans les essais précédents, ainsi que le montre le tableau ci-dessous :

NUMÉRO	NOM ET SEXE	NUMÉRO de jours d'essai	NATURE DES ALIMENTS	CONTENU en cellulose		COEFFICIENT de digestibilité p. 100
				aliments en gr.	féces en gr.	
1	Femme Ho...	1	Chou rave.	3,244	0,618	79,1
2	—	1	Epinards.	1,892	0,1797	90,5
3	—	1	Chou blanc.	2,4566	0	100
4	—	1	Pain.	1,0564	0,1606	84,8
5	—	1	Lentilles.	5,703	3,1366	45
6	Homme J...	2	Chou blanc.	5,25	0,036	99,5
7	—	1	Chou rave.	1,456	0,2648	81,8
8	—	1	Pain.	0,718	0,296	58,8
9	Homme G...	1	Carottes.	2,3694	0,190	95,4
10	Femme Sch... diabétique tube digestif normal.	3	Chou rave, farine d'avoine, chou blanc, salade.	13,38	2,85	78,7

Lohriscch compare ensuite la digestion de la cellulose par des hommes normaux et par des hommes atteints de constipation chronique, de dyspepsie avec fermentation, de diarrhée d'origine gastrique, de stéatorrhée au cours d'ictère et de stéatorrhée dans les maladies du pancréas.

Il met ses sujets trois jours à la diète de Schmidt et Strassburger et détermine l'utilisation de la cellulose de la purée de pomme de terre. Dans ces essais, comme dans les essais précédents, on délimite les féces par addition de poudre de carmin aux aliments. Nous ne donnerons que les valeurs moyennes de ces nombreuses expériences.

NUMÉRO	DIAGNOSE	CONTENU en cellulose		COEFFICIENT de digestibilité p. 100
		aliments en gr.	féces en gr.	
1-5	Normal.	2,6748	1,1269	57,9
6-11	Constipation chronique.	2,6381	0,4934	81,4
12-13	Dyspepsie.	2,6748	1,6707	37,8
14-15	Diarrhée gastrique.	3,1328	2,2035	29,5
16	Stéatorrhée (ictère).	2,6748	1,93	27,8
17	Stéatorrhée (maladies du pancréas).	2,6748	2,1168	20,9

A ces résultats, nous pouvons ajouter ceux qu'il a obtenus plus tard [143] avec trois diabétiques qui ont digéré 69,1 p. 100, 78,7 p. 100 et 84,4 p. 100 de cellulose de chou blanc.

Les derniers essais faits sur l'homme sont ceux de M. Rubner [134]. La méthode de dosage qu'il emploie est celle de W. Hofmeister [55]. Avant de doser la cellulose, il détermine la quantité de membranes cellulaires contenue dans les aliments et les fèces en traitant ceux-ci par l'alcool chlorhydrique et l'hydrate de chloral. Au besoin, il se débarrasse de l'amidon en le faisant digérer par un extrait de malt.

Ses expériences sont faites sur des hommes bien portants et durent en général plusieurs jours. Il fait absorber du lait et du fromage, avant et après la période d'essai, pour délimiter facilement les fèces.

Voici les valeurs moyennes des résultats qu'il a obtenus :

FRUITS ET LÉGUMES	COEFFICIENT de digestibilité
Pommes	77,74 p. 100
Chou rave.	82,60 —
Chou frisé	87,07 —
Fraises	33,76 —
Pommes de terre	82,95 —
Carotte.	90,36 —
PAINS et pains additionnés de pommes de terre	COEFFICIENT de digestibilité
Pain de froment (grains entiers)	2,45 p. 100
Pain de froment (farine fine).	78,4 —
Pain de seigle (blutage à sec).	38,6 —
Pain de seigle (blutage humide)	49,2 —
Pain de seigle à 65 p. 100 de blutage	51,7 —
Même pain + 20 p. 100 de farine de pommes de terre.	42,6 —
Pain de seigle à 82 p. 100 de blutage.	30,5 —
Même pain + 20 p. 100 de farine de pommes de terre.	35,4 —
Pain de seigle à 94 p. 100 de blutage	20,18 —
Klopfersbrot à 94 p. 100 de blutage.	33,11 —
Finklersbrot	47,29 —
Pain de seigle à 75 p. 100 de blutage	21,93 —
Pain de glumes de seigle.	77,62 —
PAINS faits avec des produits de substitution	COEFFICIENT de digestibilité
Farine fine de glumes	40,5 p. 100
Farine de glumes plus grossière	24 —
Paille préparée	2,73 —

Tous les essais que nous venons de résumer donnent donc des résultats semblables. La cellulose est, à n'en pas douter, digérée par l'homme. Celle des grains de céréales, en particulier celle du son, et celle des légumes durs sont moins digestibles que celle des légumes tendres. On peut ne pas tenir compte de l'essai négatif de Kniriem, essai très court du reste, ni de l'essai négatif de Rubner qui donne à des nourrissons de la poudre d'épinards. Nous ne nous étendrons pas ici sur ces résultats négatifs. Nous en reparlerons en étudiant la cause de la dissolution de la cellulose. Le fait que nous retiendrons est que tous ces auteurs ont constaté une digestion notable de la cellulose qu'ils n'ont pas expliquée.

B. *Essais de digestion faits sur les animaux.*

a) ESSAIS SUR LES HERBIVORES. — Depuis Haubner [48], qui le premier a montré que le bœuf digère la cellulose brute, on a fait de nombreux travaux.

Nous les résumons dans les tableaux suivants :

NOM D'AUTEURS	ANIMAUX	NATURE DES ALIMENTS	COEFFICIENT de digestibilité p. 100
Haubner [48]. . .	Vache.	Foin des prairies	61
		Foin des prairies + paille d'orge.	61
Haubner [49]. . .	Vache.	Foin des prairies	78
Henneberg et Stobmann [54].	Bœuf.	Paille d'avoine	55
		Paille d'orge	52
		Paille de haricots	36
		Foin de trèfle	39
		Foin des prairies	60
V. Hofmeister [56].	Mouton.	Foin des prairies	53,9
V. Hofmeister [57].	Cheval.	Avoine + foin + paille . . .	20,04
Kühn, Aronstein et Schulze [86].	Bœuf.	Foin de trèfle	53,6
		Foin des prairies	64,8
		Paille d'avoine	63,8

NOM D'AUTEURS	ANIMAUX	NATURE DES ALIMENTS	COEFFICIENT de digestibilité p. 100
Stohmann [152].	Chèvre.	Foin des prairies	38
V. Hofmeister [59].	Mouton.	Foin des prairies + paille d'avoine + carottes.	40
Kühn et Fleischer [87].	Vache.	Foin des prairies	60
Henneberg [52].	Mouton.	Foin des prairies	59,7
Weiske [168].	Porc.	Vesce + avoine.	48,87
Müntz [115].	Cheval	Maïs Avoine de Russie Féverole Son de blé Son de riz Foin de la Brie Paille de blé	47,4-82,8 31,4-72,64 82,99 77,63 84,88 63,7-81,18 52,2-60,4
Müntz et Girard [116].	Cheval.	Foin des prairies	79,9 (moyenne)
Müntz et Girard [117].	Cheval.	Avoine Féveroles. Carottes Sarrasin	33,7 (moyenne) 45,9-55,35 90,2 5,2
Müntz et Girard [118].	Cheval.	Orge	52,6 (moyenne)
Wilsing [178].	Chèvre.	Foin des prairies	60
Kniriem [79].	Lapin.	Tranches de choux Foin Papier filtre Farine de carottes. Sciure Feuilles de choux. Poudre d'écorce de noix. Trèfle ayant passé une fois dans le tube digestif. Trèfle ayant passé deux fois dans le tube digestif. Cellulose brute de paille.	25,36 52,47 54,3 65,03 20,49 77,99 5,03 40,79 22,04 21,59
Weiske, Schulze et Fleschig [175].	Mouton.	Paille d'avoine Ecorce de haricots	47,48 52,74

NOM D'AUTEURS	ANIMAUX	NATURE DES ALIMENTS	COEFFICIENT de digestibilité p. 100
Stohmann [152].	Mouton.	Foin des prairies + pois . . .	62,2
Henneberg et Pfeiffer [53].	Mouton.	Foin des prairies	53,8
		Paille d'orge pulvérisée . . .	60,6
Lehmann et Vogel [93].	Mouton.	Foin des prairies	60,71
		Farine de riz	34,37
		Navet	100
		Paille d'orge pulvérisée . . .	100
Grandeau et Alekan [40].	Cheval.	Foin	36,14
		Avoine	40,42
		Avoine et paille d'orge . . .	31,67
		Maïs et paille d'avoine. . . .	47,06
		Maïs et paille de blé.	34,39
		Feveroles et paille d'avoine. .	37,13
		Tourteau et paille d'avoine. .	34,87
		Pomme de terre et paille d'avoine.	43,80
		Sucre et foin	38,95
Waentig et Gierisch [163].	Cheval.	Sucre et maïs.	44,99
		Bois de pin naturel	22,6
		Bois de pin <i>braunschliff</i> . . .	10,3
Thomas et Prings- heim [156].	Lapin.	Pommes de terre	50,7
		Papier	33,8
	Mouton.	Pommes de terre	56,1
		Papier	58

Dans tous ces essais, la méthode de dosage employée est celle de Weende plus ou moins modifiée. Il est à noter aussi qu'à cause de la difficulté de faire des délimitations exactes de fèces chez les animaux à long tube digestif, on leur donne l'alimentation d'essai plusieurs jours avant de commencer à recueillir leurs matières fécales.

La méthode de J. König [82] a été employée par O. Kellner [75] et par König lui-même. O. Kellner ne dose que la cellulose brute, tandis que König détermine à la fois la cellulose brute et la cellulose pure.

Kellner donne à deux bœufs une ration d'entretien composée de 4 kilogrammes de foin des prairies, 3 kilogrammes de mélasse, 1 kilogramme de poudre d'*Arachis hypogæa* et 40 grammes de

sel. Il ajoute à la ration les substances étudiées et détermine les coefficients de digestibilité.

Voici ses résultats :

NATURE DES ALIMENTS	COEFFICIENT de digestibilité p. 100	
	chez le bœuf H	chez le bœuf J
Ration d'entretien + 4 kilogrammes de farine de paille de froment	55,2	60,7
Ration d'entretien + 4 kilogrammes de foin des prairies	65,3	66,3
Ration d'entretien + 2 kilogr. 5 de farine d'amidon	65,4	74,2
Ration d'entretien	66,2	68
Ration d'entretien + 3 kilogrammes de paille traitée par de la lessive de soude sous pression.	82,6	83,2
Ration d'entretien + 2 kilogr. 5 de mélasse.	69,2	70,4

Dans ses essais J. König a trouvé :

ANIMAUX	NATURE DES ALIMENTS	COEFFICIENT de digestibilité p. 100	
		cellulose brute	cellulose pure
Lapin .	Son de blé + lait	16,39	20,66
Mouton.	Foin d'herbe avant la floraison	70,27	83,4
	Foin d'herbe pendant la floraison.	64,31	73,08
	Foin d'herbe après la floraison.	46,89	56,72
	Foin de trèfle avant la floraison.	56,96	75,22
	Foin de trèfle pendant la floraison	52,16	62,97
	Foin de trèfle après la floraison	39,46	54,84
	Paille de pois	42,45	51,09
Porc. .	Son de blé + grains de blé + lait	13,96	19,28
	Son d'orge + lait	23,67	»
	Son de pois + lait.	71,70	73,73
	Sarrasin + lait	27,49	32,29

K. Thomas et Pringsheim [156], dans leurs essais sur le lapin et le mouton, font des dosages de cellulose pure par la méthode de Cross et Bevan [22]. Le lapin digère 31 p. 100 de cellulose de pomme de terre, 22,3 p. 100 de papier, tandis que le mouton digère 34,30 p. 100 de cellulose de pomme de terre et 57,1 p. 100 de papier.

Ces tableaux montrent donc que même les celluloses les plus dures, comme celles de paille, de son et de bois sont digérées par les herbivores et que les celluloses les plus tendres, comme celles de navet et de carotte, disparaissent en totalité ou presque en totalité dans leur tube digestif.

b) ESSAIS SUR LES CARNIVORES. — A part un essai de Kniriem sur le hérisson, tous les essais ont été faits sur le chien. Ils sont résumés dans le tableau ci-contre.

Chez ces animaux, comme chez l'homme, il est très facile de débarrasser le tube digestif de tout résidu végétal ou de délimiter les fèces par addition de poudre de carmin ou d'os aux aliments.

Les résultats des essais de digestion de cellulose par le chien sont contradictoires. Ainsi que Thomas et Pringsheim le font remarquer, cela peut s'expliquer par la composition variable de la flore intestinale. Nous insisterons davantage sur ce fait quand nous parlerons de la cause de la dissolution de la cellulose dans le tube digestif.

Il nous reste à mentionner quelques expériences faites sur des oiseaux, des chenilles et des escargots.

Weiske [173] donne à des oies des pissenlits, des prêles ; von Kniriem [80] nourrit des poulets avec de l'ouate, du papier filtre, de la paille de seigle et des tranches de choux. Ces deux auteurs ne peuvent prouver la digestion de la cellulose. Ils emploient la méthode de Weende pour leurs dosages. Metchnikoff-Berthelot [111] constatent que la Roussette digère 7,08 p. 100 de papier filtre. Lohrisch [98] nourrit des chenilles de *Sphinx euphorbiæ* avec des feuilles d'*Euphorbia cyparissias*, mais ces chenilles ne digèrent pas la cellulose. Le même auteur montre que l'*Helix pomatia* digère 40,1 p. 100 de la cellulose de salade. Il emploie pour ses dosages la méthode de Simon-Lohrisch.

Tous ces essais nous prouvent donc que l'homme et de nombreux animaux peuvent, dans des conditions normales, digérer une quantité notable de cellulose.

Nous passerons maintenant en revue les différents facteurs qui influent sur cette digestion.

NOM D'AUTEURS	ANIMAUX	NATURE DES ALIMENTS	COEFFICIENT de digestibilité p. 100	MÉTHODE de dosage employée
Voit et Hofmann [161]	Chien.	"	0	Weende.
Kniriem [79]	Chien. Hérisson.	Ouate, toile, herbe. . . . Cellulose de paille. . . .	0 0	Weende.
Lohrisc [97]	Chien.	Cellulose pure de chou blanc + viande. . . .	24,65 moyenne	Simon Lohrisc.
Scheunert et Lötsch [139]	Chien.	Cellulose de chou blanc + viande	0	Simon Lohrisc et König.
Lohrisc [99]	Chien.	Chou blanc desséché pul- vérisé + viande. . . .	0	Simon Lohrisc.
Hösslin [66]	Chien.	Chou blanc cuit + viande.	0	Simon Lohrisc.
Rubner [134]	Chien.	Viande + bois de bouleau. Viande + son de blé. . . . Viande + épinards Viande + carottes. . . . Viande + noisettes fraîches. Viande + noisettes sèches Viande + coques de noi- settes. Viande + gyrolles. Viande + farine de glumes fine Viande + farine grossière de glumes. Viande + farine de seigle. Viande + farine de blé. . . Viande + cellulose pure. Viande + farine de vesce. Viande + poudre de pommes de terre crues. Viande + poudre de pommes de terre cuites	40,52 24,96 29,67 13,62 54,32 81,74 41,78 31,35 26,46 16,47 52,48 0 30,6 moy 30,4 39,94 29,2	W. Hofmeister.
Thomas et Pringsheim [156]	Chien.	Cellulose	0	Cross et Bevan.
Waentig [162]	Chien.	Viande + pommes de terre + paille séchée et broyée. Viande + pain d'orge + 20 p. 100 de paille Viande + paille d'orge na- turelle	7,5 0 10	Weende.

CHAPITRE III

FACTEURS INFLUANT SUR LA DIGESTION DE LA CELLULOSE

On a essayé de déterminer le rôle joué par :

1° L'AGE DES ANIMAUX. — Enzmann [32] croit que les animaux digèrent d'autant moins de cellulose qu'ils sont plus jeunes, mais d'après Münz et Girard [117] un cheval âgé de dix ans digère 45,90 p. 100 de cellulose de fèves, un de quatre ans, 55,35 p. 100, un de douze ans, 81,06 p. 100.

2° LA RACE DES ANIMAUX. — V. Hofmeister [58] donne à des moutons mérinos et à des moutons des Southdowns des gâteaux de colza, des pommes de terre, de la paille d'avoine, du foin; H. Weiske [173] nourrit des moutons de Rambouillet et des moutons des Southdowns avec un mélange de foin, d'orge et de haricots, et ces auteurs trouvent une même utilisation de la cellulose par ces animaux de races différentes.

3° L'ÉTAT DES ALIMENTS. — Dans les essais de Kühn [88] la vache digère 58,2 p. 100 ou 52 p. 100 de cellulose de trèfle, selon qu'il est frais ou sec, et dans ceux de Pfeiffer [127] le mouton digère tantôt 73,65 p. 100, tantôt 70,93 p. 100 de cellulose de carottes, suivant qu'elles sont fraîches ou sèches.

La manière de sécher les aliments influe peu sur la digestibilité de la cellulose. En effet, Kellner [179] trouve que des moutons qui digèrent 48,13 p. 100 de cellulose de luzerne

séchée avec soin n'en digèrent plus que 45,26 p. 100 quand la luzerne a été mouillée et qu'elle a séché dans les champs.

On a remarqué depuis longtemps que la cellulose des aliments tendres, non encore lignifiés, est plus facilement digérée que celle des aliments durs. La cellulose de carotte est mieux digérée par l'homme que celle des lentilles ou des balles de blé; la cellulose de foin tendres, coupés avant la floraison, disparaît en plus grandes proportions dans le tube digestif des animaux que celle de foin coupés après la floraison. C'est pourquoi on a essayé de se débarrasser des matières incrustantes par divers traitements.

Depuis les premiers essais de Haubner [48], de Lehmann [91], qui traitent la paille par de la lessive de soude diluée sous pression, on a fait de nombreux travaux. Nous ne pouvons les résumer tous, car cela nous entraînerait trop loin (1). Nous donnerons à titre d'exemple, ceux de W. Godden [37 bis]. Il étudie la digestion, par deux moutons, de la cellulose de paille de blé traitée par la lessive de soude à 1,25 p. 100 pendant une heure à l'ébullition. Il trouve que ces animaux digèrent en moyenne 60,4 p. 100 de paille naturelle, 87,4 p. 100 de paille préparée non lavée et 83,3 p. 100 de paille préparée et lavée. On a du reste, dans ces dernières années, essayé de nourrir les animaux et même l'homme avec des poudres de bois, de paille, etc., ainsi traitées. Les résultats obtenus avec les herbivores sont tout à fait satisfaisants. La paille ou le bois préparés ont la valeur d'un bon fourrage. Mais le chien digère très peu, souvent même pas du tout, ces aliments et on peut dire que pour l'homme, ils n'ont aucune valeur (Thomas et Pringsheim 56, Max Rubner [134]). En revanche W. Ellenberger et P. Waentig 31 ont pu nourrir des chevaux de labour pendant une semaine avec de la paille préparée additionnée d'un peu de foin, d'avoine et de poudre de viande.

4° LA QUANTITÉ DE CELLULOSE DONNÉE. — H. Weiske [171] donne à un mouton une certaine quantité de foin et d'avoine. Cet animal digère 36,06 p. 100 de la cellulose qu'ils contiennent. Si la même quantité est donnée en trois fois, le coefficient de digestibilité tombe à 33,8 p. 100, mais il est clair que cet écart,

(1) On trouvera les indications bibliographiques à la fin de l'Index (p. 107).

inférieur à 3 p. 100, n'est pas probant. Il a aussi essayé d'augmenter les rations d'avoine d'un mouton, mais les résultats obtenus sont contradictoires : quand la ration contient 93 gr. 5 de cellulose, le mouton digère 49,6 p. 100 de cette cellulose ; quand elle n'en contient plus que 84 gr. 5, 10,4 p. 100 disparaissent et si la quantité de cellulose donnée tombe à 52 grammes le mouton en digère 34,7 p. 100. Rubner-Wicke [176] voient le pourcentage de cellulose digérée passer de 49,2 à 4,1 quand la quantité qu'ils donnent sous forme de pain varie de 0 gr. 79 à 8 gr. 27, mais Rubner [134] qui groupe dans un tableau général, sans tenir compte de la nature de l'aliment, les différentes quantités de cellulose ingérée, constate que le coefficient de digestibilité ne change pas lorsque cette quantité passe de 1 à 70 grammes par jour.

5° LES ALIMENTS AJOUTÉS. — Cruzius [23] a remarqué le premier que l'addition d'huile fait augmenter de 19 p. 100 la quantité de cellulose digérée par le bœuf. Henneberg et Stohmann [54] constatent la même chose ; mais cette action favorable n'a pu être observée avec d'autres animaux. V. Hofmeister [56] veut connaître l'influence de l'addition de quantités croissantes d'huile d'olive sur la digestion de la cellulose de foin et d'avoine. Ses moutons qui en digéraient 43,41 p. 100 n'en digèrent plus que 49,13 p. 100, 12,19 p. 100 et 7,06 p. 100 si on ajoute à leur ration 4, 6 et 8 demi-onces d'huiles. Stohmann [152] avec la chèvre, Wicke et Weiske [177] avec des moutons arrivent aux mêmes conclusions.

On a dit que si on ajoute de l'amidon ou du sucre aux aliments la quantité de cellulose qui disparaît diminue. C'est ce qu'ont montré les essais de Henneberg et Stohmann [54], Stohmann [152], Hofmeister [56], Weiske et Fleschig [172]. Mais dans les essais de Kellner [75] on constate que le coefficient de digestibilité ne change pas.

Il nous reste à mentionner un essai de Weiske qui donne à des moutons du foin humecté d'acide sulfurique dilué sans que la digestion de la cellulose soit modifiée, et enfin la remarque faite par Knirriem [80] que des lapins dont les besoins d'azote ne sont pas satisfaits digèrent moins de cellulose que ceux qui sont en équilibre azoté.

CHAPITRE IV

VALEUR NUTRITIVE DE LA CELLULOSE

On a beaucoup discuté sur la valeur nutritive de la cellulose. Depuis Henneberg et Stohmann [54] qui ont donné à la cellulose la même valeur qu'à l'amidon, bien des opinions ont été émises. On les trouvera résumées par H. Lohrisch [97] dans son article « Ueber die Verdauung und Verwertung der Rohfaser und Zellulose im tierischen und menschlichen Organismus ». Nous ne retiendrons que les faits principaux. En admettant que toute la cellulose introduite dans le tube digestif ne se transforme pas en hydrates de carbone solubles et assimilables, mais qu'elle est décomposée par fermentation en gaz carbonique, méthane, acides acétique et butyrique, ainsi que le pense Tappeiner [155], elle est un aliment producteur d'énergie. Elle est aussi capable de remplacer l'amidon et les graisses et de servir indirectement à la mise en réserve d'azote. Kellner et Kohler [75] ont dit que la cellulose peut être un aliment d'une réelle valeur quand le travail de mastication n'est pas trop considérable, et Wilsing [178], ainsi que Mallèvre [101] ont vu que les acides gras volatils sont brûlés dans l'organisme et qu'on ne les retrouve pas dans l'urine.

Il est évident que la cellulose n'a de valeur que pour les animaux qui en absorbent beaucoup. Peut-être en a-t-elle une aussi pour l'homme végétarien. Mais l'homme soumis à un régime mixte absorbe quotidiennement très peu de cellulose, et sa valeur nutritive est négligeable à côté de celle de l'amidon et des autres hydrates de carbone ingérés. Lohrisch [97] calcule que 100 grammes de cellulose absorbée peuvent remplacer

29 grammes de graisse en admettant que 71 p. 100 de cette cellulose disparaissent dans le tube digestif. Pour l'homme, la cellulose joue un tout autre rôle que celui d'aliment. Elle est un excitateur intestinal, favorise les mouvements péristaltiques et augmente le volume du bol alimentaire.

Récemment on a fait remarquer que l'absence de cellulose dans l'alimentation peut être nuisible à l'homme. R. Lecocq [90] dit que les troubles de croissance chez les enfants peuvent être dus à une insuffisance de cellulose dans leurs aliments. Pour éviter ces troubles il conseille d'introduire dans le régime des quantités suffisantes de lest sous forme de salades cuites, épinards, fruits, etc... Il s'appuie sur les expériences de Funk [35], d'Osborne et de Mendel [422] qui ne peuvent élever des rats et des poulets dont la nourriture ne contient pas d'aliment grossier. Les symptômes que présentent ces animaux ont, dit-il, la plus grande analogie avec les troubles de croissance. H. Péneau et M. Simonnet [426], par des expériences sur des rats, constatent que l'adjonction de cellulose améliore l'assimilation intestinale et contredisent ainsi Em. Abderhalden [4] qui avait remarqué, chez un chien, que le bilan azoté devenait négatif quand on incorporait de la cellulose à ses aliments. Avec Weill et Mouriquand [466] ils pensent que certains troubles intestinaux de l'homme peuvent s'expliquer par l'absence, dans les aliments, de substances résiduelles inattaquables par les sucs digestifs.

CHAPITRE V

AGENTS DE DISSOLUTION DE LA CELLULOSE

Avant de parler des causes de la dissolution de la cellulose, nous dirons qu'elle se dissout dans la portion du tube digestif des herbivores, où elle séjourne le plus longtemps. Chez les ruminants, l'attaque commence dans la panse, mais elle est surtout intense dans le cæcum. C'est aussi dans le cæcum du cheval que la majeure partie de la cellulose disparaît.

Comme une grande quantité de cellulose est digérée par ces animaux, on a tout naturellement pensé qu'ils sécrétaient une diastase capable de la transformer et qu'on pourrait la trouver et la précipiter dans les sucs digestifs, dans les extraits d'organes ou même dans le liquide obtenu après expression du contenu cæcal.

Nous donnerons quelques expériences avec détail avant de passer aux recherches faites sur les animaux inférieurs, sur les diastases végétales et sur les micro-organismes.

A. Recherches sur la cellulose du tube digestif des animaux supérieurs.

Mac Gillavry [109] croit que l'extrait glycéринé de l'appendice du lapin dissout la cellulose avec formation d'un sucre réducteur, mais ses essais répétés et contrôlés par Degtiareff [24] (d'après Zuntz) se sont montrés négatifs. Schmulevitch, d'après Biedermann et Moritz [16], dit que la pancréatine joue un grand rôle dans la dissolution de la cellulose, mais il ne dit

pas s'il opère en présence d'antiseptiques, ce qui enlève toute valeur à ses affirmations. V. Hofmeister [60] recherche l'action sur la cellulose des sucs digestifs de différents animaux. Selon lui, le suc gastrique du cheval est sans action, la salive mixte du mouton est très active, celle de la vache l'est beaucoup moins et celle du cheval ne l'est pas du tout. Les liquides obtenus par expression du contenu intestinal [30] dissolvent la cellulose, tandis que ceux préparés par macération du pancréas et des muqueuses intestinales dans de l'eau phéniquée se montrent inactifs. A. Scheunert [137] reprend les expériences de V. Hofmeister sur la salive du mouton et montre qu'elle est sans action sur la cellulose. On peut en conclure que les essais de Hofmeister n'ont pas été faits dans des conditions de stérilité absolue. H. T. Brown [48] croit que la salive humaine est sans aucune action sur les membranes cellulaires de l'orge ; il en est de même de la salive du cheval. Plus tard, Holdefleiss [62] recommence les essais de Hofmeister. Il filtre des extraits des muqueuses de la panse et du cæcum du mouton, à travers un tamis de soie. Il les fait agir sur de la cellulose et n'obtient pas de dissolution après six jours. Le résultat n'est pas meilleur si les extraits sont préparés avec le contenu de la panse et du cæcum. Comme il croit que la filtration lente et le contact de l'air nuisent à l'activité des diastases, il recommence ses expériences avec des extraits phéniqués non filtrés. Il obtient alors une dissolution d'environ 10 p. 100 avec dégagement de gaz carbonique et de méthane, mais cet essai ne nous permet pas de conclure que les herbivores sécrètent une cellulase.

Il était nécessaire de refaire ces expériences en évitant toutes les causes d'erreur. C'est ce qu'ont fait P. Bergman [9], A. Scheunert [136], H. Lohrlich [98], et W. Ellenberger [29].

P. Bergman [9] fait des extraits aqueux des muqueuses rectales des poules et de l'intestin grêle des oies, des cobayes, des lapins, des moutons, des chevaux, des bestiaux, et dans ces extraits, il ne réussit pas, par des digestions artificielles à l'étuve (38°, vingt à vingt-quatre heures), à prouver l'existence d'une cellulase. Il emploie 2 p. 100 de toluène comme antiseptique.

A. Scheunert [136] recherche une cellulase dans le contenu du cæcum des porcs, des lapins et des chevaux. Il filtre le con-

tenu cæcal trois fois : tout d'abord, il le fait passer à travers une toile fine pour le débarrasser des particules les plus grossières ; le liquide obtenu est alors filtré à travers un filtre en papier serré qui retient les protozoaires et enfin ce dernier filtrat est stérilisé par une filtration faite à l'aide d'une bougie Berkefeld. Cette dernière opération n'est possible qu'avec les liquides du cæcum des chevaux. Voici les résultats que A. Scheunert obtient en mettant 1 gramme de cellulose de foin en contact avec 50 cent. cubes de liquide à l'étuve à 38° pendant soixante-cinq heures : le liquide qui passe à travers une toile dissout 25,3 p. 100 de cellulose, celui qui est filtré sur papier n'en dissout que 10,3 p. 100 et le filtrat obtenu à l'aide d'une bougie, que 8,5 p. 100. Ce dernier filtrat perd ses propriétés par l'ébullition. Scheunert n'a pu, par l'alcool, y précipiter une cellulase. Il essaie aussi, sans succès, d'extraire une cellulase de la muqueuse du cæcum. Il conclut que la dissolution de la cellulose dans le tube digestif des animaux est le fait des bactéries, qu'elle dépend du nombre de ces bactéries et du temps de séjour des aliments dans l'intestin.

H. Lohrlich [98], avec des extraits de pancréas et de muqueuses intestinales de porc, et avec du suc pancréatique obtenu par expression, ne peut dissoudre la cellulose en présence de 2 p. 100 de toluène. Il reprend les expériences de Scheunert sur les liquides du cæcum de cheval passés à travers une toile ; dans certains cas, 50 p. 100 de la cellulose est dissoute. Les liquides stérilisés par l'ébullition n'ont plus aucune action. Voulant préciser le rôle joué par les bactéries, il ensemence des tubes de bouillon avec les liquides filtrés ; la culture est abondante. Il ensemence alors des filtrats stériles avec ces cultures en bouillon ainsi qu'avec des filtrats qui ont été laissés vingt-deux heures à l'étuve et qui ont dissous la cellulose. Il n'obtient aucune attaque dans ces conditions. De plus, comme il a eu des résultats négatifs en présence de thymol et de toluène, il n'ose conclure que les bactéries jouent un rôle dans la dissolution de la cellulose. Quelques faits l'inclinent à croire qu'elle est due à des diastases : les filtrats abandonnés à la température de la chambre perdent vite leurs propriétés dissolvantes, un séjour prolongé à l'étuve diminue leur activité d'environ 40 p. 100, tandis que la température de la glacière (favorable aux diastases, nuisible aux bactéries) ne la

modifie aucunement. Dans tous les cas, les cultures en bouillon ont été très abondantes.

Nous devons faire remarquer que les essais de dissolution de cellulose avec les filtrats ayant subi divers traitements sont relativement courts : ils ne durent que quatre-vingt-huit heures tout au plus. Nous retiendrons encore des essais de Lohrlich celui qu'il a fait en présence d'acide phénique [98]. La dissolution de la cellulose a eu lieu malgré cet antiseptique. Cela pourrait nous expliquer les résultats positifs de Holdesleiss [62] avec des extraits phéniqués non filtrés.

Les derniers travaux dont nous parlerons sont ceux de W. Ellenberger [29]. Cet auteur recherche si une cellulase est sécrétée par les animaux. Il a essayé de faire agir la salive, les sucs de l'estomac, de l'intestin, du pancréas et la bile sans mettre en évidence un ferment cellulosique. Il prépare des extraits des glandes de l'intestin, du foie, du pancréas, des trois estomacs et de l'œsophage ainsi que des extraits de la muqueuse des différentes parties du tube digestif et spécialement des organes lymphoïdes (amygdales, follicules du palais, de la langue, et de l'intestin) sans plus de succès. Il ne lui est pas possible non plus de précipiter une cellulase dans les liquides obtenus en passant à travers une toile le contenu du cæcum. Il fait remarquer que tous les liquides qu'il a employés dans ses essais de digestion de cellulose possédaient leur pouvoir fermentaire normal et il en conclut que la dissolution de la cellulose est due à des micro-organismes.

B. *Recherches sur la cellulase du tube digestif des animaux inférieurs.*

Knauthe [77], Knauthe et Zuntz [78] obtiennent un extrait de l'hépatopancréas de la carpe qui dissout la cellulose en présence de thymol et de chloroforme, mais il a été impossible à Muller [114] de reproduire ces expériences. Biedermann et Moritz [17], Muller [114], Lohrlich [98], et J. S. Alexandrowicz [4] disent que le suc de l'hépatopancréas de l'*Helix pomatia* dissout la cellulose. Pacaut et Vigier [125] remarquent que la cellulose de la moelle de sureau résiste à l'action des sucs de l'*Helix pomatia*. G. Sellière [149] constate que la cellulose de certains cotons naturels est attaquée par le suc digestif de

ce même *Helix* et que les celluloses, traitées par le chlorure de zinc ou par des lessives alcalines à 25 p. 100 jusqu'à ce que les fibres soient gonflées, sont facilement hydrolysées. Si on dissout la cellulose dans la liqueur de Schweitzer et qu'on la précipite, on obtient un produit qui, humide, est beaucoup plus aisément attaqué par le suc de l'*Helix* que la cellulose primitive. La dessiccation, en particulier la dessiccation dans le vide, diminue notablement cette digestibilité. Le produit d'hydrolyse de la cellulose par le suc de l'*Helix* est du glucose.

S. G. Albrecht [3] montre que les sucs des mollusques marins de la côte du Pacifique ne dissolvent pas la cellulose, et Harington 47 dit qu'il en est de même des extraits aqueux hépatiques du *Teredo norvegica*.

On voit donc qu'il n'est pas facile, non plus, de prouver l'existence d'une cellulase chez les animaux inférieurs phytophages.

C. Influence sur la digestion de la cellulase contenue dans les aliments.

H. T. Brown [48] croit que l'embryon de l'orge contient une enzyme capable de dissoudre la cellulose dans l'estomac des animaux. Il nourrit deux porcs A et B, à jeun depuis trois jours, de la manière suivante :

A reçoit de l'orge grossièrement pulvérisée ne contenant pas d'enzyme cytohydrolytique.

B reçoit la même orge additionnée de 10 p. 100 d'orge germée, séchée à l'air, très hydrolytique.

Les deux animaux sont tués trois heures après leur repas et l'on examine leur contenu stomacal.

Celui de A présente le même aspect que l'orge primitive. Les membranes cellulaires sont intactes. Le contenu stomacal de B a un aspect tout à fait différent. Les membranes cellulaires sont dissoutes et le contenu de la cellule libéré est désintégré.

Brown en conclut que l'enzyme préexistante dans l'embryon est seule capable de dissoudre la cellulose des aliments, puisque les extraits de muqueuse du porc et que, d'autre part, ses essais de digestion avec la salive du cheval n'ont donné aucun résultat. Pour lui, de plus, le rôle des bactéries est négligeable, car leur action s'exerce très lentement.

Scheunert et Grimmer [138] ont recherché si les aliments qu'on donne d'ordinaire aux herbivores contiennent une cellulase. Leurs essais ont porté sur l'avoine, le maïs, la pomme de terre, le riz, les pois, l'orge, le seigle, le froment, la paille de seigle, le foin, les graines de lupin, le blé noir, la vesce et les féveroles. Ils laissent soixante-douze heures à l'étuve, à 37°, 3 grammes de substance avec 50 cent. cubes de solution de soude à 0,2 p. 100. La cellulose contenue dans la prise d'essai est dosée par la méthode de Weende; un deuxième dosage après le séjour à l'étuve indique s'il y a une perte de cellulose. Dans aucun cas, la cellulose n'a été dissoute. Ils en concluent qu'il n'y a pas de cellulase dans les aliments.

Le rôle des cellulases végétales dans la digestion de la cellulose par les animaux est donc négligeable, leur nourriture habituelle n'en contenant pas. De plus, on a vu qu'ils digèrent la cellulose de paille ou de bois préparés qui ne contiennent évidemment pas d'enzymes, et que l'homme digère la cellulose des légumes cuits dont la cellulase, si elle existe, est détruite par l'ébullition.

La digestion de la cellulose par l'homme et les animaux ne peut donc pas s'expliquer par l'action d'une diastase animale ou végétale.

Nous exposerons maintenant les recherches qui ont été faites pour montrer l'action des micro-organismes dans la dissolution de la cellulose.

D. Rôle des micro-organismes dans la dissolution de la cellulose.

On a étudié l'action des champignons et des microbes sur la cellulose. Nous serons très brève sur le rôle joué par les champignons, la description de toutes les espèces isolées sortant du cadre de ce travail. Nous mentionnerons seulement les travaux de Van Iterson [69], de Beijerinck [8], de Domenica Carbone [19], de Kellermann [72], de H. Pringsheim [131], de Mac Beth et Scales [106], de Clarke et Scales [21], de Scaks [135], de Wehmer [165], de Curt Mütterlein [119], de S. F. Acree [2], de P. Sée [148], de N. I. Kosin [83], d'Adeline Ames [5]; de O. Kress [84]. Mais nous nous étendons sur les travaux de W. Ellenberger [29] qui a pu isoler une moisissure du groupe des

Aspergillus en partant du contenu de la caillette des ruminants, du contenu stomacal de tous les animaux domestiques, intestinal du mouton, cæcal du cheval, stomacal et intestinal du porc.

Cette moisissure est assez active; elle dissout 8,62 p. 100 de la cellulose donnée (1 gramme) en quatorze jours et ne perd pas son pouvoir dissolvant par réensemencement. Elle sécrète une cellulase qu'il a été possible d'isoler.

Nous donnerons avec plus de détails les travaux qui ont été faits sur les microbes qu'on a recherchés dans le sol, dans le fumier, dans les boues d'égout, sur les végétaux en putréfaction, dans le tube digestif des animaux, etc.

Mitscherlich [113] remarque que les membranes des cellules de pommes de terre en macération dans l'eau sont détruites par des vibrions. Trécul [157] signale l'existence de plantules amylières dans les cellules végétales en putréfaction. Van Tieghem [159] décrit une espèce anaérobie, le *Bacillus amylobacter*, analogue aux plantules amylières de Trécul, qui attaque la cellulose de pommes de terre et laisse intacte celle des fibres du liber. Ce bacille produit, au moment de sa sporulation, de l'amidon qui imprègne son protoplasme et se colore en bleu par l'iode. En réalité, cette espèce qui n'était pas pure n'attaque pas la cellulose, mais les hémicelluloses. On appelle aujourd'hui *Bacillus amylobacter* des ferments butyriques qui ont porté des noms variés, mais dont les particularités morphologiques sont semblables, et qui se développent dans les mêmes milieux nutritifs. Leur action sur les hémicelluloses n'est pas constante et ne peut les caractériser; quelques variétés sont capables d'attaquer la cellulose.

La question, très complexe, de la classification de tous ces microbes a été résolue par Bredemann [17] qui donne les caractères permettant de les identifier.

Prazmowski [130] cherche à obtenir une dissolution de cellulose avec le contenu du gros intestin du cheval et du bœuf. Il trouve l'*Amylobacter* de Van Tieghem et deux autres espèces qu'il décrit sous les noms de *Vibrio regula* et de *Clostridium polynya*.

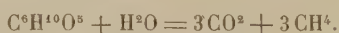
Ces espèces ne peuvent être considérées comme pures et n'ont qu'un intérêt historique.

Popoff [129] obtient une fermentation très lente avec des

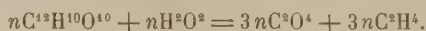
boues d'égout et constate qu'il se forme du gaz carbonique et du méthane. Tappeiner [155] a fait de nombreux travaux sur la dissolution de la cellulose par le contenu de la panse, du côlon et du cæcum du bœuf, ainsi que par le contenu du côlon et du cæcum du cheval. De grands flacons, remplis jusqu'aux bords d'une solution d'extrait de viande Liebig additionnée de papier ou de coton sont ensemencés et mis à l'étuve. La fermentation commence au bout de cinq à dix jours. Les produits de décomposition de la cellulose sont de l'hydrogène, du gaz carbonique, du méthane et des acides butyrique et acétique. Les fibres qui restent dans le flacon sont imprégnées de bactéries qui ont la forme de bâtonnets à spore terminale ou subterminale. Tappeiner n'a pas obtenu d'espèces pures.

Ses expériences nous prouvent que la cellulose peut être dissoute par les microbes dans le tube digestif des animaux.

Pour P. P. Dehérain [25], le dégagement de formène observé dans le fumier privé d'oxygène, est dû exclusivement à l'action des ferments figurés. U. Gayon [36] obtient avec le fumier de véritables fermentations anaérobies et remarque la présence d'un microbe extrêmement petit, cultivable dans des liquides nutritifs contenant de la paille ou du papier. Les gaz recueillis sont du gaz carbonique et du méthane. Pour Hoppe-Seyler [64], la fermentation de la cellulose du papier par des boues d'égout repose sur l'activité du *Bacillus amylobacter* avec formation de gaz carbonique et de méthane suivant la formule



Th. Schlœsing fils [141] étudie les fermentations aérobie et anaérobies du fumier; il détermine les températures optimas ainsi que la nature des gaz à différentes températures. Th. Schlœsing père [142] étudie la composition et la quantité des gaz formés (gaz carbonique, méthane) perdant la fermentation du fumier. Les chiffres qu'il donne permettent à M. Berthelot [10] de faire remarquer qu'il s'agit d'une fermentation cellulosique suivant la formule



A. Hébert [50], plus tard, pourra affirmer que la perte des substances de la paille porte surtout sur la cellulose.

Van Senus [150] suit au microscope la destruction des parois

cellulaires de pommes de terre, de haricots, etc... Il dit que la cellulose est détruite par deux microbes : le *Bacillus amylobacter* et un autre bacille très petit, isolé de l'intestin du lapin. Chacun de ces microbes pris à part serait sans action sur la cellulose. Il pense que le méthane formé n'est qu'un produit secondaire et que la fermentation cellulosique ne donne que de l'hydrogène, du gaz carbonique et de l'acide acétique. L'hydrogène réduirait l'acide acétique en alcool, en aldéhyde et enfin en méthane ; c'est pourquoi Hoppe-Seyler n'aurait trouvé que du gaz carbonique et du méthane. On ne peut admettre que difficilement cette réduction de l'acide acétique par l'hydrogène. L'explication de P. Mazé [103] est beaucoup plus satisfaisante. Il a isolé du sol une pseudo-sarcine qui utilise, dit-il, les produits des fermentations butyriques (acides acétique, butyrique, hydrogène) pour former du méthane. Nous comprenons ainsi pourquoi les auteurs ont presque toujours signalé la présence de gaz carbonique et de méthane dans les cultures impures et ont rarement trouvé de l'hydrogène.

Van Iterson [69] isole du sol un bacille aérobie, le *Bacillus ferrugineus* qui désagrège le papier en lui donnant une couleur jaune brun. C'est un bâtonnet petit, mobile, qui se trouve en association avec un microcoque. Van Iterson croit que ce bacille joue un grand rôle dans la nature. Il a fait l'expérience suivante :

Il met dans le sol un chiffon de lin, du papier filtre et au bout de six mois, il ne retrouve pas trace du papier filtre, tandis qu'il ne reste que des morceaux de chiffon ramollis, gélatineux, d'où il a pu isoler le *Bacillus ferrugineus*.

Van Omeliansky [123] étudie la fermentation de la cellulose par les bactéries anaérobies qui se trouvent dans le limon de la Néva. Ses travaux sont classiques. Nous les exposerons avec détail.

Pour essayer d'obtenir des cultures pures, il se sert du milieu électif de Winogradsky, solution assez pauvre qui permet d'éliminer de nombreuses espèces. Elle est composée de :

PO ⁴ K ² H	1 gramme
SO ⁴ Mg	0 gr. 5.
SO ⁴ (NH ⁴) ²	1 gramme
NaCl	traces
H ² O distillé.	1.000 grammes
CO ² Ca	»

et additionnée de cellulose (soit des bandes de papier Berzélius, du coton ou un précipité amorphe de cellulose). Des flacons remplis jusqu'au col de cette solution sont placés à l'abri de l'air à 30-35°. Au bout de cinq à dix jours, la cellulose commence à devenir jaunâtre, transparente, gélatineuse et ne laisse qu'un faible résidu; en même temps, la craie ajoutée est dissoute. De ces premières cultures, il a pu obtenir deux espèces de bactéries capables d'attaquer la cellulose : le bacille de la fermentation hydrogénée et le bacille de la fermentation méthanique. Morphologiquement les deux espèces sont voisines; voici leurs caractères :

Bacille de la fermentation hydrogénée. — On l'obtient si l'on prend la précaution de chauffer les cultures dès le premier ensemencement. C'est un bâtonnet dont la spore terminale ronde résiste vingt-cinq minutes à la température de 90°. Il ne forme pas de chaînette, se colore par les couleurs d'aniline et ne se colore jamais par l'iode. Il vit sur la fibre cellulosique à laquelle il adhère par toute sa surface. On peut suivre les différentes phases de destruction de la fibre qui est, dans les vieilles cultures, remplacée par une masse bacillaire; les bandes de papier sont percées d'une multitude de petits trous plus ou moins rapprochés les uns des autres. Ce bacille n'attaque que la cellulose en donnant du gaz carbonique, de l'hydrogène, des alcools non caractérisés, des acides acétique, butyrique, valériannique en quantités variables. Il est très difficile de faire pousser le bacille dans des milieux solides. Il ne pousse pas sur des bandes de papier humectées de solution nutritive, ni sur gélatine; sur gélose, il donne quelquefois de petites colonies qui sont trop chétives pour que le réensemencement soit possible. Même sur pomme de terre, la croissance des colonies (très petites, jaunâtres, transparentes) est des plus faibles et le bacille dégénère rapidement sur ce milieu. Pour l'obtenir, Omeliansky recommande d'ensemencer les résidus de cellulose imprégnés de microbes et de chauffer à 90°. En répétant cette opération plusieurs fois de suite, on a une culture qui ne contient plus que le bacille de la fermentation hydrogénée et une autre espèce à spore terminale ovale qu'on peut isoler et qui n'attaque pas la cellulose. La quantité de cellulose qui disparaît est presque de 96 p. 100.

Bacille de la fermentation méthanique. — On peut l'isoler si on a soin de ne pas chauffer dès le premier ensemencement. Il prédomine sur toutes les autres espèces, et après quelques repiquages, on peut chauffer les cultures afin de l'avoir pur. C'est un bacille plus mince que le bacille de la fermentation hydrogénée, à spore terminale plus petite. Il a la forme typique d'une baguette de tambour. Il n'attaque la cellulose qu'en présence de carbonate de calcium et forme du gaz carbonique, du méthane, des acides acétique et butyrique; il ne donne pas d'alcool ni de sucre réducteur. Il n'a pas été possible de le faire pousser sur des milieux solides.

Biejerinck [8] étudie l'action du *Bacillus ferrugineus* et des anaérobies sur du papier humecté d'eau du robinet additionnée de phosphate bipotassique et de nitrate d'ammoniaque. Ankerschmit [6] ensemence le milieu d'Omeliasky avec le contenu intestinal des bovidés et voit la cellulose disparaître, mais les microbes qu'il a isolés se sont révélés inactifs, ce qui lui fait croire que leur rôle dans la digestion n'est pas important.

Hösslin et Lesser [67], au contraire, sont persuadés que ce sont des microbes anaérobies qui dissolvent la cellulose dans le tube digestif du cheval. Ils font remarquer que ces bactéries préfèrent le glucose, comme source d'énergie, à tout autre hydrate de carbone et ils essaient de protéger la cellulose de l'action microbienne en ajoutant du glucose à leurs cultures. Ils filtrent à travers une toile le contenu du cæcum du cheval et font trois séries d'essais :

- 1° Avec le filtrat stérilisé;
- 2° Avec le filtrat tel quel;
- 3° Avec le filtrat tel quel additionné de glucose.

Dans le troisième essai, il n'y a pas plus de cellulose dissoute que dans le premier, tandis que dans le second, la quantité qui disparaît est de beaucoup plus importante. Ils en concluent que la fermentation de la cellulose ne peut se faire, dans ces conditions, par une enzyme, mais seulement par des bactéries. Leurs essais d'ensemencement de filtrat stérile avec le contenu du cæcum passé à travers une toile fournissent un argument favorable à cette conclusion. Sur 16 essais, 5, dont 3 ont été faits en présence de peptone de Witte, sont positifs. Si leurs résultats ne sont pas meilleurs, c'est, disent-ils, parce que le milieu de culture employé ne convenait pas aux bactéries.

Distaso [26] isole de l'intestin du poulet le *Bacillus cellulosaë desagregans*, bacille très grêle à spores ovalaires subterminales; il se colore mal par la méthode de Gram. C'est un anaérobie facultatif qui pousse à 37°. Il n'attaque pas le lactose, le maltose, ni le saccharose; il ne donne pas de gaz en gélose glucosée et transforme l'amidon en dextrose. On peut obtenir des cultures dans des solutions minérales additionnées de papier Berzélius; on voit, après quelques jours, le papier s'amincir progressivement, se désagréger et former des flocons composés de fibres. L'action de ce bacille ne va pas plus outre. Il désagrège également la pomme de terre, la salade, les petits pois, les flageolets, en donnant des sucres. On peut se demander si cette espèce est vraiment une espèce qui décompose la cellulose quand on lit cette phrase : « Il est possible, à cause de cette digestion non complète, que le papier de Berzélius ne soit pas absolument pur. »

J. Choukevitch [20] isole de l'intestin des bovidés un *Bacillus amylobacter* Bredemann qui fait fermenter la cellulose et l'amidon. Il constate aussi que le contenu de l'intestin du cheval dissout la cellulose, mais que les microbes qu'il a isolés sont sans action.

E. Merker [440] essaie d'isoler les micro-organismes qui font aux feuilles d'*Elodea* les blessures qu'on remarque surtout à l'automne. Il met, dans des tubes, des bandes de papier dont la moitié inférieure plonge seule dans une solution nutritive. Sur la partie non immergée, il voit se développer deux micrococci qu'il n'a pas obtenus à l'état pur et dont voici les caractères :

Micrococcus cytophagus. — Micrococcus jaunâtre, ovoïde, immobile, non cilié, aérobie. La cellulose, sous son action, devient transparente, jaunâtre. Dans les cultures de trois semaines, on ne voit plus les fibres qui sont remplacées par un amas de cocci.

Micrococcus melanocyclus. — Coccus immobile, sans cils, un peu ovoïde. Il pousse sur la cellulose, sans l'attaquer beaucoup, en formant des cercles concentriques noirs, ou des cercles rouges qui noircissent.

Ce pigment a des réactions colorées qui permettent de le

rapprocher de la carotine. Il ne pousse pas sur gélatine ni sur pomme de terre.

K. F. Kellermann et I. G. Mc Beth [73] prétendent avoir isolé des cultures des Bacilles des fermentations hydrogénée et méthanique mises à leur disposition par Omeliansky, trois espèces nouvelles aérobies, dont deux ne sont pas sporulées : les *Bacillus flavigena*, *amylolyticus* et *rossica*. Ces espèces poussent dans les milieux les plus variés, attaquent de nombreux hydrates de carbone avec formation d'acides, et donnent sur des plaques de cellulose-agar, des colonies entourées d'une zone claire due à la dissolution de la cellulose par l'enzyme. Il n'y a pas de dégagement gazeux. Omeliansky [124] n'admet pas ces conclusions. Il fait remarquer que les espèces qu'il a étudiées résistent à la température de 90°, et qu'elles sont strictement anaérobies. De plus, la zone claire lui paraît un criterium bien faible pour juger de la fermentation de la cellulose. Cette zone, très petite du reste, peut être causée par la dissolution du carbonate de calcium par des acides ou par la destruction des produits organiques de l'eau et de l'agar. Enfin les détails donnés, ajoute-t-il, sont abondants sur les caractères secondaires et manquent sur le point principal, qui est la dissolution de la cellulose.

G. Mütterlein [119] isole aussi du sol une espèce aérobie qui forme une zone claire sur des plaques de cellulose-agar et Lohnis et Lochhead [95] font remarquer que la zone d'enzyme est grande par rapport à la colonie. Kellermann, Mc Beth, Scales et Smith [73, 74, 105, 106, 107] ont trouvé dans le sol une trentaine d'espèces aérobies qui attaquent la cellulose. Elles produisent des zones claires sur plaques de cellulose-agar et ne donnent pas de gaz. Mc Beth [105] indique pour les espèces qu'il a étudiées que la cellulose peut fermenter en présence de bouillon et qu'elle est désintégrée en particules qui tombent à la moindre agitation : le *Bacillus ingis* fait même des trous dans le morceau de papier. Cet auteur dit aussi qu'il a trouvé des acides acétique et formique, mais ne s'étend pas sur ce sujet.

Nous empruntons à ses derniers travaux [105] le tableau suivant. Il résume les caractères des différents microbes aérobies qui attaquent la cellulose.

H. B. Hutchinson et J. Clayton [68] isolent par la méthode des dilutions une espèce aérobie, le *Spirochaeta cytophuga*, en

	MORPHOLOGIE				CARACT.			
	Dimensions en microns	Nombre de cils	Spores	Formes d'involucron	GÉLOSE			
					Culture luxuriante	Pigment jaune	Bouillon trouble	Gélatine liquéfiée
<i>B. albidus</i>	1 X .4	1-3	—	—	—	—	—	—
<i>B. almus</i>	1,2 X .6	1-5	—	—	—	+	+	—
<i>B. amyroloticus</i>	3,5 X .7	10-16	+	—	+	—	+	+
<i>B. aurogenus</i>	1,4 X .4	1-3	—	—	+	+	+	+
<i>B. bibulus</i>	1,3 X .4	1-4	—	—	+	—	+	+
<i>B. biazoteus</i>	.8 X .5	1-3	—	—	+	+	+	+
<i>B. caesus</i>	1,5 X .4	1-2	—	—	—	—	+	+
<i>B. cellaseus</i>	1,2 X .5	1-3	—	—	—	—	—	+
<i>B. concitatus</i>	1,2 X .5	1-3	—	—	+	+	+	+
<i>B. cytaseus</i>	2,7 X .5	10-18	+	+	—	—	—	—
<i>B. desidiosus</i>	1 X .4	1-3	—	—	—	—	+	—
<i>B. festinus</i>	2 X .6	1-3	+	—	—	—	—	—
<i>B. galbus</i>	1 X .4	1-3	—	—	+	+	+	+
<i>B. gelidus</i>	1,2 X .4	1-3	—	—	+	—	+	—
<i>B. gilvus</i>	1,5 X .5	1-4	—	—	—	+	+	—
<i>B. imminutus</i>	1,5 X .2	1-5	+	+	—	—	—	—
<i>B. ingis</i>	1,4 X .4	1-3	—	—	—	—	+	+
<i>B. pusilus</i>	1,1 X .6	1-3	—	—	—	—	+	—
<i>B. rosicus</i>	1,2 X .3	1-5	—	+	+	—	+	+
<i>B. subalbus</i>	.8 X .4	1-3	—	—	+	—	+	—
<i>Bact. acidulum</i>	1 X .3	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bact. castigatum</i>	1,2 X .4	—	—	—	+	—	+	—
<i>Bact. fimi</i>	.9 X .4	—	—	—	+	—	+	—
<i>Bact. flavigenum</i>	1 X .4	—	—	—	+	+	+	+
<i>Bact. idoneum</i>	1,5 X .5	—	—	—	—	+	+	+
<i>Bact. liquidum</i>	1,7 X .4	—	—	—	+	+	+	+
<i>Bact. lucrosum</i>	1,3 X .4	—	—	—	+	—	+	—
<i>Bact. paludosum</i>	1,5 X .4	—	+	—	+	—	+	+
<i>Bact. udum</i>	1,5 X .5	—	—	—	+	—	+	+
<i>Ps. arguta</i>	.8 X .3	1-2	—	—	—	—	+	—
<i>Ps. effusa</i>	1,7 X .4	1-6	—	—	+	+	+	+
<i>Ps. minuscula</i>	.9 X .5	1-2	—	—	+	—	+	+
<i>Ps. mira</i>	1,6 X .4	1	—	—	+	—	+	—
<i>Ps. perlurida</i>	1 X .4	1-3	—	—	+	—	+	+
<i>Ps. subcreta</i>	1,4 X .4	1-5	—	—	—	—	—	—
<i>Ps. translucida</i>	1,2 X .5	1-2	—	—	—	—	+	—

DE CULTURE

AIT TOURNESOLÉ			DUNHAM'S solution		SOLUTION de nitrate			POURCENTAGE D'ACIDITÉ EN 12 JOURS A 30°							CO- RAT
Rougi	Blanc	Coagulé ou digéré	NH ³	Nitrite	NH ³	Nitrite	Indol	Dextrose	Lactose	Saccharose	Maltose	Glycérine	Mannite	Amidon	Gram
+	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
+	-	-	-	-	-	-	-	1,3	0,8	1	1,2	0,4	0	0,6	-
+	-	-	-	-	-	-	-	0,9	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9	1,4	-
+	-	+	+	+	+	+	-	1,8	1,4	1,4	1,2	0,7	0	1,6	-
+	-	-	+	+	-	-	+	1,8	1,3	1,5	1,5	0,4	1,2	2	-
+	-	-	-	+	-	+	-	2	1,1	1	0,9	0,5	0	1,5	-
+	-	+	+	+	+	+	-	1,9	1,5	1,4	1,1	0,5	0,2	1,4	-
+	-	-	-	+	-	-	-	1,4	0,4	1,4	0,8	0,3	1,2	1,2	-
+	-	-	-	-	-	+	+	1,8	0,85	1,3	1,3	0,45	0	1,35	-
+	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	-
+	-	-	-	+	-	+	+	0,8	0,1	0	0,6	0	0	0,2	-
+	-	+	-	-	-	+	+	0,5	0,4	0	0,65	0,05	0	0,6	-
+	-	-	+	+	-	-	+	1,4	1,3	1,2	1,3	1,2	0	1,3	-
+	-	+	+	+	-	-	-	1,2	1,2	0,8	1,2	0,4	0	1,4	-
+	-	-	+	+	-	+	+	1,2	0,75	0,8	1	0,4	0	1	-
+	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	-
+	-	-	+	+	-	+	-	0,8	1,1	0,6	1,55	0,45	0,2	1,5	-
+	-	-	+	+	-	+	-	1,5	1,4	1,6	1,4	0,5	0	1,5	-
+	+	-	+	-	-	+	-	1	-1,4	-1,4	-1,6	-1,4	-1,5	-1,2	-
+	-	-	+	+	-	+	-	1,6	1	1,4	1,2	0,7	0,2	1,4	-
+	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,3	0,3	0,5	0	0	0	-
+	-	-	-	+	-	-	-	1,5	1,1	1	1,45	0,55	0	1,4	-
+	-	-	+	+	-	+	+	1,6	0,9	1,6	1,4	0,8	0	1,6	-
+	-	-	-	+	-	+	-	1	0,9	0,7	0,9	0,3	0,1	1,4	-
+	-	-	-	+	-	+	-	1,6	1,2	1,2	1,4	0,7	0	1,4	-
+	-	-	+	-	-	+	+	1,3	1	1,3	1,2	0,2	0	1,4	-
+	-	-	-	+	-	-	-	0,2	0,1	0	0,15	0	0,5	0,15	-
+	-	-	-	+	-	-	+	1,1	0,8	1	1,2	0,4	0,5	1,2	-
+	-	-	-	+	+	+	-	1,4	1,3	1,4	1,2	0	0	1,4	-
+	-	-	-	+	-	-	-	0,3	0,1	0	0,2	0	0	0,3	-
+	+	+	+	-	-	+	-	2,1	- 5	- 7	0,6	0,3	0,2	1,2	-
+	+	-	-	+	-	+	+	1,2	1,1	1	1,1	0	0	0,9	+
+	-	+	+	-	-	+	-	1,25	0,5	1,1	1,2	0,3	0,25	1,5	-
+	-	-	+	-	-	-	-	1,8	1,5	1,5	6,2	0,6	1,5	2	-
+	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,5	0,1	0,5	0	0	0,6	-
+	-	-	-	+	-	+	-	1,3	0,7	1,6	1	0,4	0,2	1,6	-

ensemencant le sol de Rothamsted dans une solution composée de :

PO ⁴ K ³ H	1 gramme
CaCl ²	0 gr. 1
SO ⁴ Mg	0 gr. 3
NaCl	0 gr. 1
Fe ³ Cl ³	0 gr. 01
NO ³ Na.	2 gr. 50
Cellulose	10 grammes
H ² O	1.000 grammes

La cellulose est transformée en mucilage pectique, en pigment jaune voisin de la carotène et en acide butyrique. On n'observe pas de dégagement gazeux. Le *Spirochæta cytophaga* a la forme d'un filament droit ou incurvé de 3 μ sur 0,3 à 0,4 μ ; on peut trouver aussi des formes ayant jusqu'à 40 μ . Il ne possède pas de cils et n'est animé que de quelques mouvements de translation ou d'ondulation. Il se colore très difficilement; la meilleure coloration est obtenue par l'action de la fuchsine à chaud pendant une minute. Il présente à une extrémité un renflement sphéroïdal, fréquent surtout dans les cultures anciennes, et qui ressemble à une spore ou à un coccus. Il est tué ainsi que son renflement par un chauffage de 10' à 60°. Le *Spirochæta cytophaga* préfère, comme source d'azote, les matières azotées simples : nitrates, sels ammoniacaux, amides, amino-acides à faible concentration, et la cellulose seule satisfait ses besoins de carbone. Les sucres réducteurs gênent son développement, tandis que le saccharose, le raffinose, la mannite, la dulcité, l'adonite, l'amidon, la dextrine et l'inuline ne l'empêchent pas de pousser en présence de cellulose. Mais quand elle manque il ne prolifère pas du tout. Il ne pousse pas non plus sur gélatine ou sur agar sans cellulose.

Anna Hoppfe [65] a étudié la dissolution de la cellulose par la flore microbienne de la panse du bœuf. Les premières cultures faites avec le contenu de la panse lui donnent en général de bons résultats, mais il n'en est pas de même avec les cultures pures des espèces qu'on trouve généralement dans le tube digestif. Nous résumons ses résultats dans le tableau suivant.

Elle fait remarquer que les différentes souches de ces espèces ne désagrègent pas toutes la cellulose et qu'elles perdent leur pouvoir dissolvant par le réensemencement. Elle croit que la

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>B. megatherium</i> . . .	NO ₃ K Liebig Asparagine Eau du robinet . . 100 0.35 0.5 0.5	NO ₃ K Liebig Asparagine Eau du robinet . . 190 0.35 0.5 0.5	NO ₃ Na Asparagine Liebig Eau du robinet . . 100 0.35 0.5 0.5	NO ₃ NH ₄ Asparagine Liebig Eau du robinet . . 100 0.35 0.5 0.5	NO ₃ K Liebig Eau du robinet . . 100 0.35 0.1 0.1	NO ₃ K Glucose Eau du robinet . . 100 0.35 0.1 100	NO ₃ K Liebig Glucose Eau du robinet . . 100 0.35 0.5 0.5	Contenu de la panse + pepone	SO ₄ (NH ₄) ₂ NaCl PO ₄ K ³ H ₂ SO ₄ Mg Eau distillée . . 100 0.35 0.1 0.1	X + NO ₃ Na	+	Contenu de la panse + NO ₃ Na
<i>B. fluorescens</i> . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. butyricus</i> . . .	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—
<i>B. ellenbachensis</i> .	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
<i>B. m. sentericus vul-</i> <i>gatus</i>	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
<i>B. mycoides</i> . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+

N. - B. — Toutes ces solutions sont additionnées de cellulose sous forme de papier stérilisé par le chloroforme.

dissolution de la cellulose est possible dans des conditions normales, que le moindre changement peut l'empêcher et que la composition du milieu a une grande importance. Il est possible, dit-elle, que la cellulose soit détruite par des organismes non encore isolés.

J. Groenewege [44] a trouvé dans le sol une espèce nouvelle : le *Bacillus cellaresolvens*, variétés α , β , γ . C'est un bâtonnet très fin, aérobic, qui se colore par la fuchsine et le bleu de méthylène. Il perd assez vite sa mobilité dans les milieux liquides et forme souvent de longs filaments. Sur gélose, il donne, au bout de plusieurs jours, de petites colonies transparentes. La colonie du *Bacillus cellaresolvens* α devient vert jaunâtre au bout de quelques jours, celle du *Bacillus cellaresolvens* γ se forme beaucoup plus lentement et son diamètre ne dépasse pas $1/2$ millimètre.

Ces trois variétés diffèrent aussi entre elles par la vitesse de formation de leur diastase. C'est ainsi que, sur des plaques de gélose amidon, la zone claire de la variété α est de 2 centimètres au bout de cinq jours, celle de la variété β de 1 centimètre, et celle de la variété γ inférieure à 2 centimètres. Ces bacilles attaquent la glycérine, l'arabinose, le glucose, le lévulose, le mannose, le maltose, le galactose, le saccharose, le lactose, le raffinose, la dextrine, le glycogène, le gluten et l'amidon, et n'attaquent pas l'alcool éthylique, la mannite, la dulcité, la quercité et l'inuline dans des solutions contenant 0,1 p. 100 de NO_3K , 0,05 de $\text{PO}_4\text{K}^3\text{H}$ et 1 p. 100 d'hydrate de carbone. Comme source d'azote, le nitrate de potasse, le chlorure d'ammonium, le nitrate d'ammonium et le phosphate ammoniac-magnésien sont tout à fait suffisants. L'amygdaline même est attaquée avec formation d'acide cyanhydrique.

Groenewege emploie un procédé très élégant pour mettre en évidence la diffusion de l'enzyme cellulosique. Il prépare des plaques d'agar contenant de la poudre de cellulose colorée par du rouge congo. Le colorant fixé sur la cellulose ne diffuse que sous l'action de l'enzyme et forme, tout autour des colonies, des zones colorées en rouge. Dans ses derniers travaux, il a pu prouver que les *Bacillus cellaresolvens* forment du cellobiose et du glucose et qu'ils sécrètent une cellulase et une cellobiase. Les produits de destruction de la cellulose (acides acétique, butyrique, lactique) peuvent servir d'aliments à des

bactéries dénitrifiantes et sont oxydés en donnant $\text{CO}_2, \text{H}_2\text{O}$. La quantité de cellulose détruite est beaucoup plus grande si on cultive en symbiose les *Bacillus cellaresolvens* et les bactéries dénitrifiantes.

Il nous reste à parler de l'action des bactéries thermophiles sur la cellulose. Nous citerons seulement les travaux de Mac Fayen et Blaxall [108] ; de A. Kroulik [85] et de H. Pringsheim [132] qui obtiennent des fermentations cellulosiques par des bactéries qui poussent entre 60 et 70°. Ils n'ont pas cherché à isoler des espèces pures et toutes celles que Veillon [160] a décrites sont sans action sur la cellulose.

*
* *

Nous résumerons ce chapitre en disant que la cellulose n'est pas dissoute dans le tube digestif par une cellulase animale ou végétale, mais par des bactéries dont les espèces isolées directement de l'intestin sont peu nombreuses. Les études faites sur les sols nous aident à comprendre pourquoi si peu de bactéries de la flore intestinale ont été isolées. Les insuccès de Lohrlich, de Hösslin et Lesser qui n'emploient pas des milieux assez riches et n'opèrent pas dans des conditions suffisantes d'anaérobiose proviennent de ce que les espèces anaérobies, qui jouent très vraisemblablement le plus grand rôle dans les fermentations cellulosiques du tube digestif, sont précisément les plus difficiles à faire pousser.

Puisque la cellulose n'est pas dissoute dans le tube digestif par des diastases mais par des bactéries, les différences individuelles et les résultats contradictoires des essais de nombreux auteurs s'expliquent par la composition variable de la flore intestinale. Il faut tenir compte aussi, dans les expériences faites sur les hommes et sur certains animaux, de l'influence de la préalimentation carnée qui peut, lorsqu'elle est trop longue, éliminer les bactéries cellulosiques de l'intestin. Elles n'ont pas le temps de s'y développer et d'agir si la période d'alimentation végétale qui suit est trop courte. C'est de même à cause de l'absence, dans leur tube digestif, de bactéries faisant fermenter la cellulose que les nourrissons de Max Rubner [134] ne digèrent pas la poudre d'épinards mélangée à leur lait. Dans les essais d'alimentation, il est donc préférable, pour délimiter

les fèces, d'incorporer aux aliments de la poudre de carmin ou de la poudre d'os qui ne modifient pas la composition de la flore intestinale ou bien de faire durer l'essai assez longtemps pour que les bactéries puissent se développer. Les conditions les meilleures sont réalisées dans les expériences sur les herbivores, car les bactéries qui font fermenter la cellulose prolifèrent normalement dans leur tube digestif.

On ne peut, parmi les facteurs qui influent sur la digestion de la cellulose, retenir ni l'âge, ni la race des animaux, ni la dessiccation des aliments. On ne comprendrait pas, en effet, qu'ils pussent avoir une influence quelconque sur le développement des bactéries dans le tube digestif. Il est évident, au contraire, que l'action des bactéries s'exerce plus difficilement si la cellulose des membranes végétales est imprégnée de cutose, de lignine ou de subérine, et qu'il est nécessaire de se débarrasser de ces substances pour obtenir un coefficient de digestibilité plus élevé. Enfin, la nature des aliments ajoutés peut influencer sur la composition de la flore intestinale et faire varier le pourcentage de cellulose digérée.

Nous décrirons maintenant l'espèce que nous avons isolée de la flore intestinale de l'homme normal et nous dirons quelle est son action sur la cellulose. •

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DU BACILLUS CELLULOSÆ DISSOLVENS

CHAPITRE I

ESSAIS D'ISOLEMENT

Nous avons recherché dans la flore intestinale de l'homme normal les bactéries capables d'attaquer la cellulose chimiquement pure. Nous avons essayé d'isoler des espèces aérobies et anaérobies en nous inspirant de la technique suivie par les auteurs qui ont étudié l'action des microbes sur la cellulose. Notre dessein était de retrouver les bacilles anaérobies d'Omeliansky et les nombreuses espèces aérobies des expérimentateurs américains.

Nous avons préparé divers milieux de culture, liquides et solides :

A. *Milieux Liquides.*

1° Solution d'Omeliansky :

$\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$	1 gramme
SO^4Mg	0 gr. 5
$\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$	1 gramme
NaCl	traces
CO^2Ca	"
H^2O distillé	1.000 grammes

2° Dans cette solution, on peut remplacer le sulfate d'ammoniaque par de la peptone et ajouter un peu de gomme arabique pour rendre la culture plus facile. La peptone que nous avons employée était une peptone de viande pancréatique;

3° A la solution d'Omeliensky nous avons ajouté du nitrate de potasse (3 grammes p. 1.000) et nous avons remplacé la peptone pancréatique par de la peptone de fibrine (Witte);

4° Nous avons supprimé le sulfate de magnésie et préparé le milieu suivant :

PO ⁴ K ³ H	1 gramme
NaCl.	1 gramme
Peptone pancréatique	1 gramme
Eau du robinet.	1.000 grammes

5° Nous avons employé un mélange de phosphates composé de la sorte :

PO ⁴ K ³ H	0 gr. 5
PO ⁴ Na ³ H	0 gr. 5
NaCl.	1 gramme
Peptone pancréatique.	1 gramme
CO ³ Ca	2 grammes
Eau du robinet.	1.000 grammes

6° Enfin, nous avons préparé cette solution :

PO ⁴ K ³ H	5 grammes
NO ³ K	2 gr. 50
NaCl.	1 gramme
Peptone pancréatique	1 gramme
Eau du robinet.	1.000 grammes

Toutes ces solutions contenaient de la cellulose sous forme de papier Berzélius ou sous forme de cellulose précipitée après avoir été dissoute dans du réactif de Schweitzer.

Après avoir vigoureusement agité la solution pour obtenir une suspension homogène du carbonate de calcium, on en verse 5 cent. cubes dans des tubes qui contiennent de petits morceaux de papier de 1 cent. carré environ ou un peu de cellulose précipitée.

On stérilise à l'autoclave un quart d'heure à 110°. La réaction des milieux est neutre. Il faut avoir soin de vérifier la réaction du phosphate bipotassique du commerce qui est presque

toujours un mélange de phosphates mono et bipotassique. Il est nécessaire de le neutraliser, en présence de phtaléine du phénol, par une lessive de potasse N/10;

7° Nous avons ajouté à tous ces milieux 2 p. 1.000 de glucose.

B. *Milieux solides.*

1° Nous nous sommes servie de la gélose ordinaire au bouillon Martin et de la gélose Veillon glucosée et nitratée, l'une et l'autre en boîtes de Pétri et en tubes de gélose profonde;

2° A ces milieux nous avons ajouté, soit du papier Berzélius très finement divisé, soit de la cellulose précipitée;

3° *Cellulose-agar de Kellermann et Mc Beth* [73]. — On prépare 1 litre de solution diluée d'ammoniaque en mélangeant 3 parties d'eau à 10 parties d'ammoniaque de poids spécifique 0 gr. 90. On l'additionne d'un léger excès de carbonate de cuivre, on agite vigoureusement et on laisse une nuit en contact. Le lendemain on décante la solution à laquelle on ajoute 15 grammes de papier-filtre en morceaux et on agite de temps en temps jusqu'à ce que tout le papier soit dissous. On dilue à 10 litres et on ajoute lentement, en ayant soin d'agiter, une solution d'acide chlorhydrique au 1/5 jusqu'à précipitation complète de toute la cellulose. On dilue à 20 litres, on laisse la cellulose se déposer et on décante le liquide qui surnage. On lave par décantation avec de l'eau chlorhydrique jusqu'à obtention d'un liquide incolore. On termine par des lavages à l'eau pure afin que la réaction du chlore disparaisse. On laisse déposer le précipité de cellulose pendant plusieurs jours, on décante le plus de liquide possible, et au besoin on centrifuge pour que la quantité de cellulose soit de 1 gramme pour 100 cent. cubes d'eau.

A 500 cent. cubes de ce liquide contenant de la cellulose en suspension, on ajoute :

Agar-agar	10 grammes
PO ⁴ K ⁺ H	1 gramme
SO ⁴ Mg	1 gramme
NaCl.	1 gramme
SO ⁴ (NH ⁴) ²	2 grammes
CO ³ Ca	2 grammes
Eau du robinet.	1.000 grammes

La gélose ainsi obtenue étant trop molle, nous avons généralement additionné les 1.500 cent. cubes de liquide de 20 grammes d'agar-agar. Nous le faisons fondre dans l'eau, puis nous ajoutons les différents sels et la solution contenant la cellulose. On agite vigoureusement et on répartit dans des tubes qu'on stérilise à 110° pendant un quart d'heure. Les plaques de gélose en boîtes de Pétri sont préparées lorsqu'on en a besoin et les tubes pour gélose profonde sont remplis le plus possible;

4° Le procédé de Mutterlein [119], de Lohnis et de Lochhead [95] pour préparer des plaques de cellulose-agar est beaucoup plus simple. Il consiste à verser dans la boîte de Pétri une couche de gélose, d'étaler ensuite une feuille de papier et de verser une seconde couche de gélose qui contient une dilution des bactéries étudiées;

5° *Gélose-amidon de Kellermann et Mc Beth* [73]. — A 800 cent. cubes d'eau bouillante, on ajoute 10 grammes d'amidon de pommes de terre en suspension dans un peu d'eau froide. On évapore à 100° jusqu'à ce que le volume se réduise à 500 cent. cubes. On brise ainsi l'enveloppe des grains d'amidon et on obtient une solution presque transparente.

On prend : 500 cent. cubes de cette solution; 10 grammes d'agar-agar; 1.000 cent. cubes de solution saline (la même que pour la gélose-cellulose).

On répartit dans des tubes et on stérilise à l'autoclave à 100° pendant un quart d'heure. On verse dans des boîtes de Pétri stériles lorsqu'on en a besoin.

Avec cette solution d'amidon nous avons voulu préparer des tubes de gélose profonde. Après addition d'agar-agar, même sans carbonate de calcium, la solution est très opaque; il faut la filtrer. Cette opération est très lente et ne peut se faire qu'à l'autoclave, mais on obtient une gélose transparente qui laisse voir les colonies et permet de les isoler;

6° Nous avons humecté de la solution n° 4 des bandes de papier d'environ 1 centimètre de large sur 4 à 5 centimètres de long, et des tranches de pommes de terre et de carottes.

En possession de ces différents milieux, nous avons commencé nos essais d'enrichissement des cultures en espèces détruisant la cellulose, puis nous avons continué par nos essais d'isolement d'espèces pures.

Nous avonsensemencé tous nos milieux liquides avec des

matières fécales humaines provenant d'individus des deux sexes et dont l'âge variait entre dix et cinquante-cinq ans.

Nous avons l'habitude de faire des dilutions de fèces dans deux tubes de chaque milieu, l'un pour les cultures en aérobiose et l'autre pour les cultures en anaérobiose, et d'en ensementer plusieurs autres à partir de ceux-là. Nous n'avons pas tardé à remarquer que la cellulose n'était dissoute que dans les deux tubes primitifs où l'on avait fait la dilution. Nous avons alorsensemencé six milieux aérobie et six anaérobies avec des matières fécales.

L'anaérobiose des cultures est obtenue de la sorte : on fait bouillir les milieux pendant un quart d'heure environ pour chasser le plus d'air possible ; après refroidissement, on les ensement. Les tubes sont étirés au centre et l'air aspiré à l'aide d'une machine pneumatique. Lorsque le vide est obtenu, on scelle au milieu de l'étranglement avec la flamme de la veilleuse d'un bec Bunsen.

Nous nous sommes vite aperçue qu'il était inutile d'ajouter du glucose ou du nitrate de potasse dans nos solutions nutritives. Les cultures étaient abondantes, un dégagement gazeux se produisait dès le premier jour, mais la cellulose n'était pas dissoute. Nous avons éliminé aussi le sulfate de magnésie (milieux liquides n^{os} 1 et 2), la peptone de fibrine (n^o 3) et le mélange des deux phosphates (n^o 5), parce qu'ils ne donnaient pas de meilleurs résultats que le milieu liquide n^o 4. C'est ce dernier que nous avons employé dans nos essais ultérieurs.

La cellulose commence à se désagréger, en général, au bout de trois à cinq semaines, rarement après quelques jours, que ce soit de la cellulose précipitée ou du papier. La fermentation s'établit dans les milieux aérobie et anaérobies, de deux manières : ou bien la cellulose devient jaune orange ou bien elle reste blanche et se ramollit ; dans les deux cas elle se désagrége à la moindre secousse. Les réensemencements faits avec ces premières cultures donnent de bons résultats : il ne faut qu'une dizaine de jours pour que la désagréation commence.

C'est avec ces cultures que nous avons essayé de faire des isolements. Une fermentation cellulosique en aérobiose avait spécialement attiré notre attention ; le papier présentait une belle couleur jaune orange et se décomposait en formant des gaz, des acides et en exhalant une odeur butyrique assez forte.

Nous avons voulu obtenir sur des milieux solides des colonies isolées. Sans même avoir jamais remarqué autour d'elles la plus petite zone d'enzyme, nous avons essayé la pomme de terre, la carotte, les bandes de papier, la gélose-cellulose, la gélose ordinaire et la gélose Veillon. Tous les microbes qui poussent sur ces milieux, repiqués dans nos milieux liquides, n'ont jamais détruit la cellulose.

Après ces insuccès, nous avons essayé de faire des isolements dans les milieux liquides. Par la méthode des dilutions nous n'avons pas obtenu de cultures pures : tantôt le papier n'était pas attaqué, tantôt, lorsqu'il l'était, le milieu contenait plusieurs espèces.

Nous avons vu, ainsi que le disent plusieurs auteurs (Omeliansky, Merker, Groenewege, etc.), que les bactéries vivent attachées à la fibre cellulosique. Dans le liquide elles sont très rares. Pour nous débarrasser de celles qui y vivent, et qui sont sans action sur la cellulose, nous changions la solution dès qu'elle commençait à être trouble. Après avoir fait ainsi plusieurs fois nous constatâmes que les espèces étaient beaucoup moins nombreuses, mais que par réensemencement nous n'obtenions plus de fermentations. Nous avons fait ces réensemencements, sans plus de succès, dans tous les milieux qui nous avaient servi au début de nos recherches.

Nous avons alors supposé que ces cultures aérobies impures étaient des cultures anaérobies des bactéries qui détruisent la cellulose et que l'oxygène était absorbé par la flore associée. C'est pourquoi nous avons repris les résidus de fermentation cellulosique ne donnant plus de cultures aérobies et nous les avonsensemencés en faisant le vide dans les milieux. Nous vîmes l'attaque du papier commencer au bout d'une dizaine de jours. Il est également possible de pratiquer des repiquages successifs. Avec ces cultures nouvelles nous avons poursuivi nos essais d'isolement sur nos divers milieux solides, cette fois en anaérobiose, mais tous les microbes qui poussent dans ces milieux, repiqués dans nos milieux liquides, n'ont jamais désagrégé la cellulose. Il nous est arrivé de voir aussi sur des bandes de papier des points clairs, où la cellulose avait été décomposée, mais les prélèvements faits sur ces taches se sont montrés riches en espèces diverses sans cependant qu'aucune d'elles attaquât jamais la cellulose.

Comme nous avons remarqué, dans nos cultures, que le bacille vivant sur la fibre ainsi qu'un autre bacille étaient sporulés, nous avons essayé, sans y parvenir, d'éliminer les espèces non sporulées (colibacille et diplocoque) en les portant, soit à 100° pendant une à deux minutes, soit à 80° pendant cinq à dix minutes, soit à 50 ou à 60° pendant quinze à vingt minutes : ils résistaient ou bien, ce qui entraînait l'arrêt de la fermentation cellulosique, ils étaient tués.

Nous avons essayé d'une autre manière de nous débarrasser des espèces qui n'ont aucune action sur la cellulose. Dès que le morceau de papier commençait à présenter quelques taches jaune orange, nous le lavions, pendant dix minutes environ, dans trois boîtes de Pétri remplies d'eau physiologique. Ainsi lavé il était mis dans un tube contenant le milieu n° 4, et dans lequel on faisait le vide ; huit jours après on pouvait recommencer les lavages avec le morceau de papier du tube commencé, car il présentait à son tour quelques taches jaune orange. Mais, après lavage du fragment de papier d'un troisième tube, on n'obtenait plus d'attaque de la cellulose, même en le laissant plusieurs mois à l'étuve.

A ce moment nous ne nous trouvions plus en présence que de deux espèces : un bacille sporulé et un diplocoque. Nous pouvions donc espérer d'obtenir des cultures pures en combinant ces deux modes opératoires : lavage du papier et destruction des espèces non sporulées par le chauffage, mais l'inconvénient, c'est qu'il devenait très rapidement impossible d'obtenir des cultures.

Comme les résultats n'étaient pas meilleurs avec les différents milieux dont nous avons donné plus haut la composition, nous avons modifié notre milieu de culture en y ajoutant un extrait de matières fécales ainsi préparé : on délaie 1 partie de matières dans 8 à 10 parties d'eau distillée et on filtre sur filtre Laurent. Au début le liquide filtré est trouble ; on le remet sur le filtre jusqu'à ce qu'il soit parfaitement clair. La filtration est très lente. Le filtrat est d'abord coloré en marron clair, mais il fonce à l'air. On le stérilise à l'autoclave à 110° pendant un quart d'heure. Durant la stérilisation il se forme un précipité qu'on laisse déposer pour n'employer que le liquide clair. C'est cet extrait fécal qui entre dans la composition de notre milieu liquide n° 4 ainsi modifié :

PO ⁴ K ⁺ H	1 gramme
NaCl	1 gramme
Peptone pancréatique	1 gramme
CO ³ Ca	2 grammes
Eau	750 cent. cubes
Extrait fécal	250 cent. cubes
Cellulose	»

C'est de ce milieu qu'il s'agira désormais quand nous parlerons de milieu de culture, car c'est lui qui nous a donné les résultats les meilleurs, et nous l'avons conservé pour tous nos essais.

Dans ce milieu nous avons mis des fragments de papier lavés qui ne donnaient plus de culture et qui étaient restés six mois à l'étuve en anaérobiose. Après une incubation de trois à cinq semaines, le papier présentait une belle couleur jaune orange et se désagrégeait très facilement. Les bacilles à spore terminale, attachés à la fibre cellulosique, étaient très nombreux. On trouvait encore le diplocoque dont il était facile de se débarrasser par une ébullition de quelques minutes, et la culture était enfin pure.

Nous avons isolé un bacille anaérobie, différent de ceux d'Omeliansky, et que nous désignerons sous le nom de *Bacillus cellulosæ dissolvens*, n. sp.

Voici la technique que nous avons définitivement adoptée pour le retrouver dans les matières fécales de l'homme : il faut tout d'abord ensemencer largement plusieurs milieux de culture (6 au minimum) avec des matières fécales et réaliser un vide tel que la pression d'air ne dépasse pas 1 centimètre de mercure. La fermentation commence, en général, au bout de trois à cinq semaines, dans quelques tubes seulement. Lorsqu'elle est assez avancée, on réensemence les débris de papier qui sont ramollis, blancs ou jaunes. Dans les nouvelles cultures l'attaque est plus rapide. Après deux ou trois repiquages elle commence dès le troisième jour, les morceaux de papier deviennent jaune orange et les bacilles ont une spore ovale qui n'est pas toujours visible dans les premières cultures. A compter de ce moment, on peut chercher à isoler le *Bacillus cellulosæ dissolvens*. Dès que le fragment de papier présente quelques taches colorées, on le lave pendant dix minutes environ en le faisant passer dans trois boîtes de Pétri remplies

d'eau physiologique et on le met dans un nouveau milieu de culture. La fermentation s'établit alors plus lentement. Lorsqu'elle est très active on réensemence; on fait bouillir les tubes nouvellement ensemencés pendant cinq minutes. En combinant ces deux modes opératoires, on arrive à se débarrasser des espèces qui n'attaquent pas la cellulose. Il est indispensable de recommencer plusieurs fois en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter les contaminations. On peut aussi chauffer les cultures pendant un temps plus long, car, ainsi que nous le verrons, la spore du *Bacillus cellulosæ dissolvens* résiste longtemps à la chaleur. Il est très utile de contrôler la pureté des souches par des ensemencements dans les milieux de culture ordinaires.

En possession de ce moyen d'isolement, nous avons pu, dans soixante matières fécales, retrouver le *Bacillus cellulosæ dissolvens* trente-six fois, donc dans 60 p. 100 des cas étudiés.



CHAPITRE II

CARACTÈRES DU *BACILLUS CELLULOSÆ DISSOLVENS*

A. *Morphologie.*

Le *Bacillus cellulosæ dissolvens* a la forme d'un mince bâtonnet à spore terminale ovale (fig. 1 et 2). Les individus les plus courts ont $2\ \mu\ 5$; ils s'allongent au moment de la sporulation et peuvent atteindre $12\ \mu\ 5$; ils sont en général isolés, quelquefois groupés par deux, mais ne forment pas de chaînettes. Ils vivent attachés à la fibre cellulosique par l'extrémité non sporulée ainsi que le montre la figure 3. Le *Bacillus cellulosæ dissolvens* n'a pas de cils; nous avons vainement essayé d'en colorer par la méthode de M. Nicolle-Morax et par celle de Van Ermengen [28]. Il est immobile et ne présente qu'un mouvement d'ondulation sur place; c'est pourquoi après fixation on trouve des bacilles droits et des bacilles ondulés.

Il ne se colore pas par la méthode de Gram, mais il est facile de le colorer par la fuchsine diluée, le bleu de méthylène, le violet de gentiane, etc... Ces diverses colorations montrent que son protoplasme n'est pas homogène; il présente des espaces clairs, incolores, et des points colorés. Nous avons essayé, sans résultat, de colorer ces espaces clairs par la méthode de Romanowsky et le mucicarmine de Mayer [133].

La spore du *Bacillus cellulosæ dissolvens* est terminale, ovale, volumineuse par rapport au corps microbien; elle a $2\ \mu\ 5$ de long et $2\ \mu$ de large. Il est aisé d'en suivre le développement. A une extrémité des formes bacillaires allongées appa-

rait un point qui se colore plus fortement que le reste du corps microbien. Ce point grossit, il est d'abord circulaire et nettement ovale quand la spore est mûre. Pendant son développement on voit le corps du bacille se désagréger, se séparer complètement de la spore et dans les vieilles cultures on ne trouve plus que des spores libres. Nous avons coloré ces spores par les deux procédés spéciaux de la fuchsine anilinée à chaud, et de la fuchsine à chaud après mordantage à l'acide chromique (Moeller 28). Elles se colorent aussi par les colorants du corps microbien. Dans tous les cas, elles présentent une exospore fortement colorée, et la spore elle-même, qui n'est jamais incolore, une teinte plus claire.

Pour déterminer la résistance des spores à l'ébullition, voici comment nous procédons. Nous mettons au bain-marie les milieux. Dès qu'ils commencent à bouillir, nous les ensemençons le plus rapidement possible et reportons immédiatement les tubes au bain-marie. En opérant ainsi, nous avons vu les spores résister quarante-cinq à cinquante minutes à la température de 100°. Elles ne germent alors qu'au bout de dix jours.

La description morphologique que nous venons de donner est celle du *Bacillus cellulosaë dissolvens* poussant dans le milieu de culture qui lui convient le mieux. Sa forme se modifie quand on change ce dernier. Dans ce cas il s'amincit et perd ses spores comme on peut le voir sur la figure 5 qui le représente en bouillon Martin additionné de cellulose.

B. Conditions de culture.

La spore germe au bout de dix jours, mais, si nous partons d'une culture qui fermente abondamment, la destruction de la cellulose se manifeste au bout de trois à quatre jours. Le papier devient jauné orange et se ramollit, ou bien présente quelques taches qui vont s'élargissant. A la moindre secousse il tombe en poussière. Au microscope cette poussière apparaît formée de fibres cellulosiques recouvertes d'un enduit jaunâtre, et qui disparaissent sous un amas de microbes (fig. 4). La décomposition des petits fragments de papier dure vingt-quatre à quarante-huit heures, pendant lesquelles on observe un dégagement

gazeux; le liquide reste toujours limpide, mais, de brun foncé qu'il était avant l'ensemencement, il devient brun clair.

Influence du nombre de microbes ensemencés. — Comme le papier tombe au fond du tube et qu'il n'y a que peu de microbes

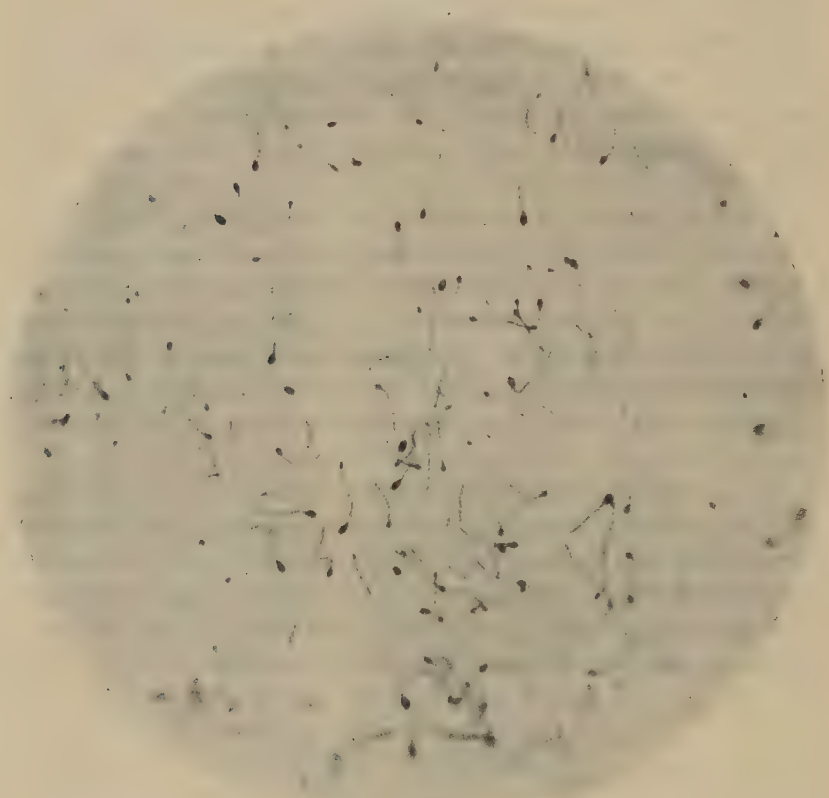


FIG. 1. — Culture en solution saline additionnée d'extrait fécal.

dans le liquide, lorsqu'on ensemence il faut avoir soin d'agiter. Avec une goutte de cette culture, ensemencée à l'aide d'une pipette Pasteur, la fermentation ne commence qu'au bout de trois à quatre semaines, mais lorsqu'on prend V gouttes environ elle commence après un séjour à l'étuve de trois à quatre jours. On a donc tout intérêt à ensemer largement.

Influence de l'oxygène. — Dans nos cultures ordinaires, nous avons l'habitude de faire le vide sans le mesurer exactement; nous nous contentons en général de faire bouillir le liquide dans le vide pendant quelques minutes jusqu'à ce que le dégagement gazeux soit très faible. Mais nous avons cherché

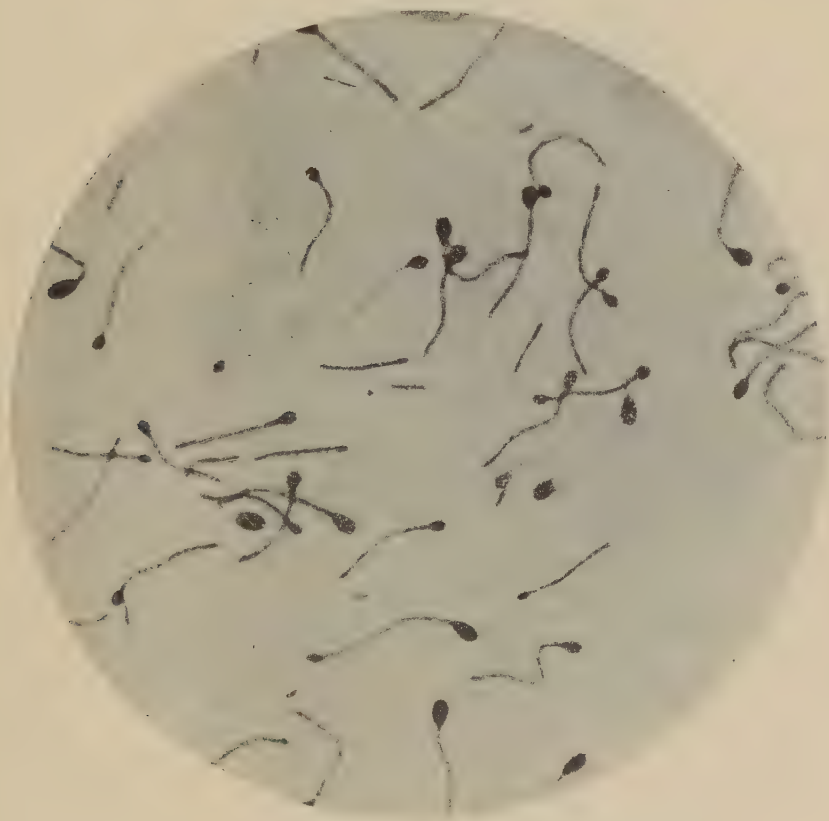


FIG. 2. — Culture en solution saline additionnée d'extrait fécal.

à connaître d'une manière exacte la pression d'air minimum qui arrête le développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens*. Nous avons fait le vide avec une trompe à mercure et mesuré la pression d'air à l'aide d'un manomètre à mercure intercalé entre la trompe et le tube du milieu de culture. Nous avons évité les causes d'erreur dues aux caoutchoucs en faisant tous

les joints à la cire Golaz. Pour que le vide soit plus facile à obtenir, nous nous sommes servie de tubes de diamètre assez large (18 à 20 millimètres), de façon à avoir une surface plutôt grande, et une hauteur de liquide (5 cent. cubes) aussi petite que possible, et, de plus, nous avons fait bouillir pendant une

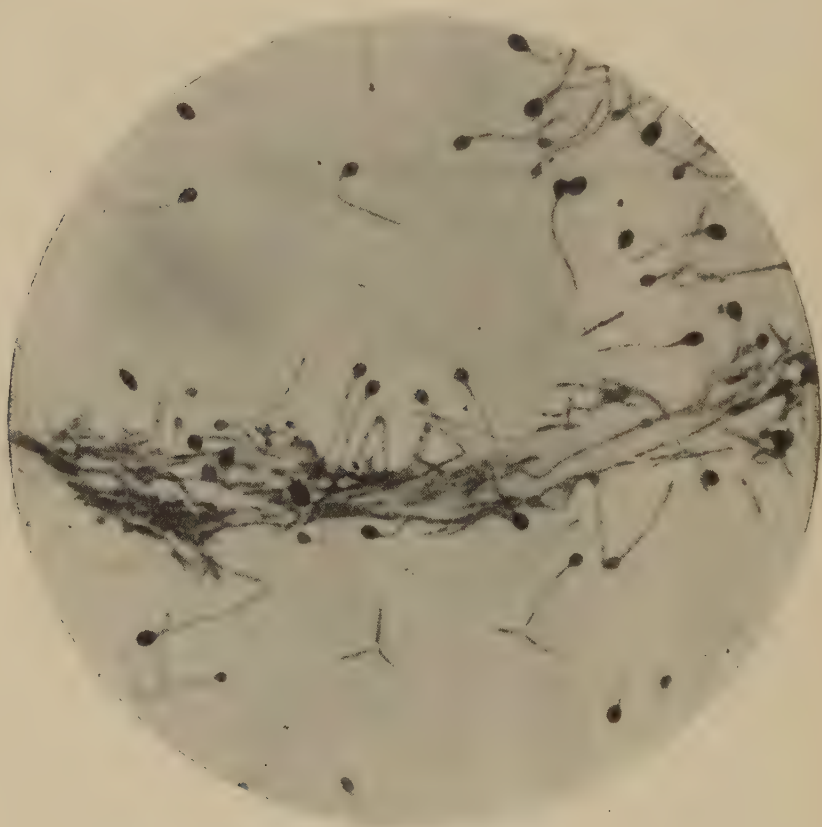


FIG. 3. — Microbes attachés à la fibre cellulosique par leur extrémité non sporulée.

demi-heure les milieux avant de les ensemer. Le vide que donne la trompe à mercure est obtenu en laissant « taper » le mercure deux à trois heures, jusqu'à ce que l'eau de distillation n'entraîne plus de bulles d'air. Nous avons de plus réalisé des pressions d'air de 2, 5, 7 et 12 millimètres de mercure, et de toutes nos expériences il ressort que le *Bacillus cellulosæ*

dissolvens pousse normalement dans les milieux où règne un vide aussi parfait que possible et dans ceux où la pression d'air ne dépasse pas 7 millimètres de mercure ; quand elle atteint 12 millimètres, on n'observe plus de développement.

Pour nous assurer que c'est bien l'oxygène de l'atmosphère

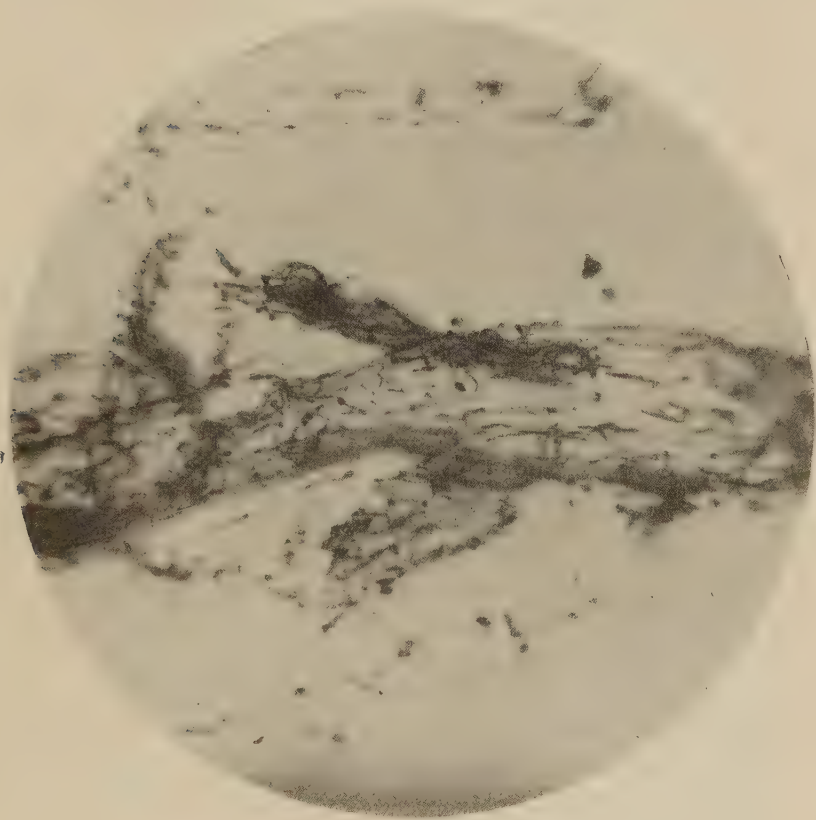


FIG. 4. — Fibres cellulosiques
se transformant en amas microbiens.

qui est toxique pour ce microbe, nous avons fait une culture en présence d'azote. Dans ce cas son développement a été normal. De plus, nous avons, dans des essais quantitatifs effectués sur de grandes quantités de cellulose, réalisé une atmosphère de gaz carbonique et d'hydrogène de la manière suivante : un ballon où règne le vide est fermé par une soupape de Bunsen.

Les gaz de la fermentation cellulosique, — gaz étudiés plus loin et qui sont composés de gaz carbonique et d'hydrogène —, emplissent à un moment donné le volume libre au-dessus de la surface du liquide. Quand leur pression est supérieure à la pression atmosphérique, ils se dégagent par la soupape. La

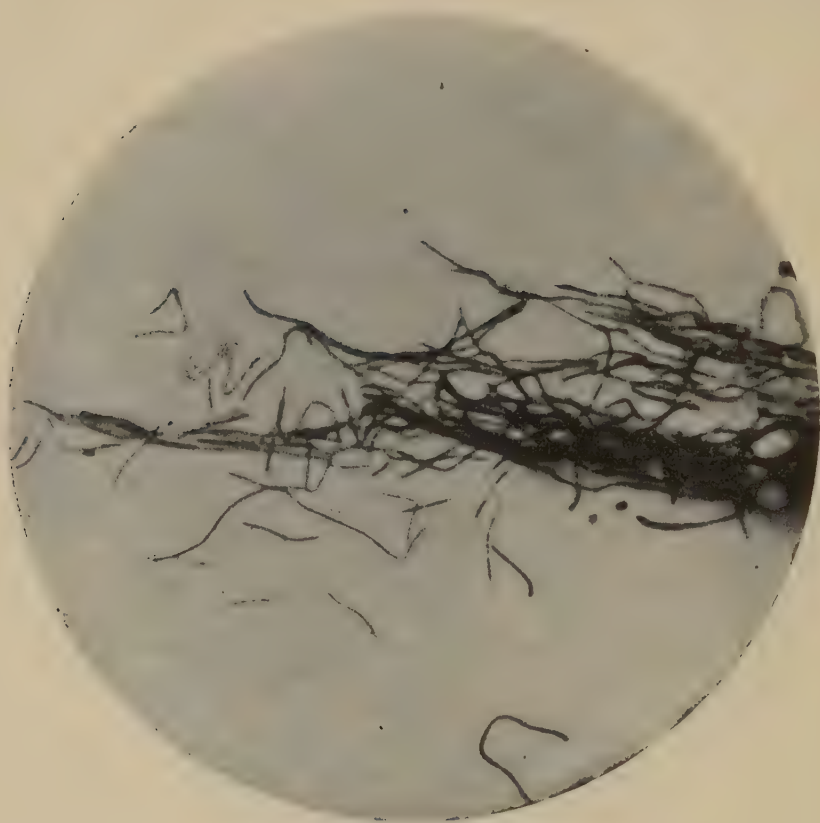


FIG. 5. — Culture en bouillon Martin additionnée de cellulose.

culture a continué en présence de gaz carbonique et d'hydrogène pendant huit mois. Nous pouvons donc conclure de ces expériences, puisque, d'une part, il est avéré que ni l'azote, ni l'hydrogène, ni le gaz carbonique, ni même l'absence totale d'air ne nuisent au développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens*, et que, d'autre part, l'air atmosphérique, à partir de

42 millimètres de pression, l'empêche de pousser, nous pouvons donc conclure que le bacille est une espèce strictement anaérobie.

Influence de la température. — Quelle est la température laquelle le développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens* est le plus rapide? Pour répondre à cette question, nous avons fait des cultures à 22°, 33°, 35°, 37°, 41°, 47°, 51°, 57°, 62° et 67°.

A 22°, pas de culture, même après deux mois de séjour à l'étuve. Si, après ce temps, on reporte les tubes à 37°, la fermentation commence au bout de neuf jours.

A 33°, le développement du bacille ne commence qu'au bout de trois semaines, tandis qu'il se fait en quelques jours (trois-quatre) de 35° à 51°, sans qu'on puisse remarquer un optimum très net.

Cependant, bien que poussant à des températures élevées, le *Bacillus cellulosæ dissolvens* n'est pas un bacille thermophile; il ne pousse pas à 57°, ni à 62°, même après douze jours d'étuve.

A 62°, le microbe et sa spore ne sont pas tués, même après douze jours d'étuve, car, remis à 37°, ils ont attaqué la cellulose au bout de six jours, tandis que des tubes laissés douze jours à 67° n'ont pas donné de culture à 37°, même après plusieurs mois de séjour à l'étuve. Il est donc bien établi que le *Bacillus cellulosæ dissolvens* n'est pas un bacille thermophile.

En ce qui concerne la digestion de la cellulose, il n'est pas sans intérêt de remarquer qu'il pousse facilement à des températures supérieures à 37°, et que, par conséquent, selon toute vraisemblance, il doit exister dans le tube digestif des herbivores.

Influence de la réaction du milieu. — Nous employons toujours, pour nos cultures ordinaires, des solutions neutres au tournesol, le carbonate de calcium neutralisant les acides de fermentation.

Nous avons remarqué que la présence de carbonate n'est pas indispensable dans les milieux qui contiennent peu de cellulose. Le développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens* est normal et des repiquages successifs peuvent être faits sans qu'on observe

des modifications morphologiques ou biologiques, bien que la réaction du milieu soit devenue légèrement acide.

Nous avons voulu déterminer le degré minimum d'acidité qui arrête la fermentation. Pour cela, nous avons préparé le milieu suivant :

PO ⁴ K ² H	0 gr. 10
NaCl	0 gr. 10
Peptone pancréatique	0 gr. 10
Extrait fécal.	25 cent. cubes
Eau	75 cent. cubes
Cellulose	1 gramme

La culture est apparue au bout de six jours et a duré dix jours. A ce moment, nous avons dosé l'acidité de la solution : 10 cent. cubes de liquide filtré sont neutralisés, en présence de phtaléine du phénol, par 1 c. c. 2 de lessive de soude N/10.

Nous avons pu vérifier ce fait une autre fois, dans des conditions différentes, dans un milieu qui contenait du carbonate de calcium, mais que nous n'avions pas pris soin d'agiter suffisamment pour neutraliser les acides au fur et à mesure de leur formation. A la fin de la fermentation, nous avons constaté que l'acidité de 10 cent. cubes de liquide filtré était neutralisée par 1 c. c. 2 de lessive de soude N/10. Cette acidité empêche le développement du *Bacillus cellulosa dissolvens* (nous verrons que la quantité de cellulose décomposée est la moitié de celle qui disparaît quand le milieu est neutre), mais elle ne le tue pas. Il est possible de faire des réensemencements lorsqu'il est resté plus de dix jours dans ces milieux acides.

Pour que la fermentation ne s'arrête pas, il est indispensable de neutraliser l'acidité. Nous nous servons de carbonate de calcium qui donne de très bons résultats si on a soin d'agiter vigoureusement matin et soir les ballons de culture et de neutraliser de la sorte les acides de fermentation. C'est ainsi que 25 grammes de cellulose ont pu fermenter pendant huit mois sans arrêt.

Nous avons voulu obtenir des cultures en milieu légèrement alcalin pour nous rapprocher des conditions intestinales. Comme l'extrait fécal se décompose à l'ébullition en présence d'alcali, on ne peut pas songer à préparer un milieu alcalin et à le stériliser à l'autoclave. Il faut ajouter l'extrait stérile à la solution alcaline titrée et stérile. Nous avons préparé, en évitant le plus

possible les causes d'erreur dues aux nombreuses manipulations et à l'évaporation dans le vide, des milieux dont l'alcalinité était de 2 p. 100 de lessive de potasse N/10 et nous avons constaté que le *Bacillus cellulosaë dissolvens* y pousse aussi bien que dans des milieux neutres et qu'il peut être réensemencé sans difficulté.

De toutes ces expériences, nous pouvons conclure que la réaction du milieu influe peu sur le développement de ce bacille.

Il n'en est pas de même de la composition du milieu.

Influence de la composition du milieu de culture. — Nous avons d'abord essayé de voir si le *Bacillus cellulosaë dissolvens* pousse dans les milieux de cultures qu'on emploie ordinairement au laboratoire et qui sont neutralisés en présence de phthaléine du phénol. Nous avons ensemencé sans aucun succès le bouillon Martin simple, le bouillon Martin glucosé, le bouillon Martin au blanc d'œuf coagulé, au foie, à la viande; la gélatine, la gélose de Veillon, le sérum coagulé et le lait tournesolé. Nos cultures sont restées un mois et demi à l'étuve sans présenter le moindre trouble. Au bout de deux à trois jours, alors que les milieux ainsi ensemencés ne révélaient à l'examen microscopique que de très rares bacilles (ceux que nous avons introduits), nous avons fait des repiquages dans notre milieu nutritif. Ces repiquages ont donné des cultures. Il est donc évident que les bacilles ensemencés dans les milieux ordinaires n'ont pas proliféré tout en restant vivants.

La figure 6 montre la culture que nous avons réalisée dans notre milieu solidifié par de la gélose au bouillon Martin : On fait bouillir le milieu à ensemencer pendant une demi-heure pour chasser l'air qu'il contient; on l'ensemence largement lorsqu'il est refroidi à 40°. Après refroidissement complet, on ajoute quelques centimètres cubes d'huile de vaseline stérile pour empêcher toute rentrée d'air. On peut aussi ensemencer le tube bouillant et maintenir l'ébullition pendant quelques minutes pour ne laisser germer que des spores. La culture commence au bout d'une dizaine de jours. Le fragment de papier présente quelques taches jaunes lorsque la culture est chauffée et il est attaqué sur une grande partie de sa surface

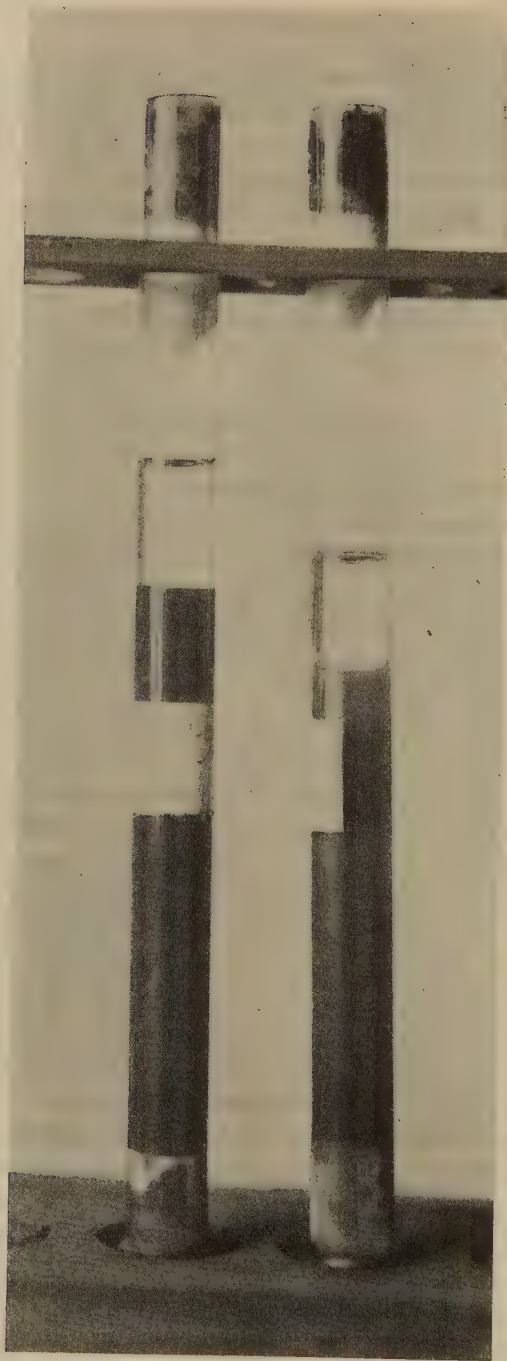


FIG. 6. — Aspect des cultures en gélose profonde contenant un fragment de papier.

lorsqu'elle ne l'est pas. Sur la figure 6, la pigmentation apparaît en noir. On voit très nettement que le *Bacillus cellulosaë dissolvens* ne forme pas de colonies, mais qu'il vit sur la fibre cellulosique elle-même. On ne peut songer à utiliser cette particularité pour faire des isollements, car, sur du papier divisé en fibrilles et réparti dans la gélose, il est impossible de remarquer la pigmentation. Il nous est arrivé une fois, tout à fait par hasard, de repiquer une fibrille qui nous a donné une culture en milieu liquide; en vain, nous avons essayé plusieurs fois de recommencer. Cet essai, en gélose, n'a d'intérêt, fait avec des cultures pures, que pour montrer l'absence totale de colonies.

Au bouillon additionné d'un morceau de foie nous avons ajouté de la cellulose, mais le *Bacillus cellulosaë dissolvens* n'a pas poussé. Avec une souche que nous possédions depuis plus d'un an et qui a été très souvent repiquée, nous avonsensemencé du bouillon Martin simple et du bouillon Martin glucosé additionnés de cellulose. L'ensemencement ayant été fait très largement, la fermentation a commencé au bout de trois jours. Nous avons alors suivi plus particulièrement le développement du *Bacillus cellulosaë dissolvens* en bouillon Martin additionné de cellulose. A partir du troisième ensemencement, la fermentation ne commence qu'au bout de six jours. Le pigment est jaune clair, le bacille perd ses spores (on n'en trouve que quelques-unes par préparation). Il devient plus mince et plus allongé. La figure 5 montre l'aspect du bacille à ce moment. Le cinquième ensemencement ne donne une culture qu'au bout de neuf jours, le morceau de papier est ramolli, blanc, et ce n'est qu'après deux à trois jours de fermentation qu'il devient jaune pâle. Au septième ensemencement, on ne voit plus du tout de spores. Les bacilles sont très minces et assez courts. Le papier ne commence à se désagréger qu'au bout de huit à dix jours. La fermentation est si lente que le dégagement gazeux ne peut être perçu. Pour le mettre en évidence, il faut secouer légèrement le tube, ce qui fait apparaître de très petites bulles de gaz. Le fragment de papier n'est désagrégé qu'au bout de quatre à six jours; il est à peine coloré. Les propriétés du *Bacillus cellulosaë dissolvens* se sont donc modifiées, par la seule raison que la composition du milieu ne répondait pas exactement à ses besoins.

Nous avons essayé à ce moment, mais sans plus de succès que précédemment, de le faire pousser en bouillon Martin simple.

Nous avons déjà donné la formule du milieu qui convient le mieux à son développement. Dans ce milieu, ses caractères sont constants et les repiquages peuvent être indéfiniment pratiqués. Une souche que nous possédons a été repiquée plus d'une trentaine de fois sans qu'il soit possible de remarquer une modification quelconque dans la morphologie du bacille, sa période d'incubation ou l'attaque de la cellulose.

Si dans ce milieu on supprime l'extrait fécal, on s'aperçoit qu'un premier ensemencement donne une culture lente, que la pigmentation du papier est peu marquée et que le bacille n'a plus de spore. Un deuxième ensemencement ne donne aucune attaque.

Le milieu d'Omeliansky, avec ou sans gomme arabique, ne convient pas du tout au *Bacillus cellulosaë dissolvens*, que la source d'azote soit de la peptone ou du sulfate d'ammoniaque.

L'addition de bile de bœuf à nos cultures s'est montrée nettement empêchante. La fermentation ne commence qu'après un mois de séjour à l'étuve et le troisième ensemencement ne donne pas de culture. Dans la bile de bœuf additionnée de cellulose, nous avons pu obtenir une seule culture. Dans tous les cas, le bacille est très mince, court et ne présente pas de spores. Cet aspect, que nous retrouverons encore, semble bien indiquer que les milieux de culture employés sont insuffisants pour assurer son développement normal.

Nous avons voulu nous assurer que l'action de l'extrait fécal ne pouvait être comparée à celle qu'exerce la vitamine B et le filtrat de cultures de *Mucor* de M. Goy [38].

Nous avons remplacé, dans nos cultures, l'extrait par quelques centimètres cubes de solution au cinquième de vitamine B provenant de la levure. La première culture est très lente; au bout de trois semaines, le papier présente quelques taches à peine colorées en jaune, le bacille n'est pas sporulé, et par un deuxième ensemencement il est impossible d'obtenir une culture. De plus, des rats dévitaminés meurent en trois jours si on ajoute à leur ration (riz glacé, caséine dévitaminée, beurre et solution saline) 3 cent. cubes d'extrait fécal alcoolique repris par l'eau.

Avant de donner les résultats obtenus avec les filtrats de

cultures de *Mucor*, nous rappellerons le procédé de M. Goy pour les obtenir. Il emploie deux filtrats qui proviennent de cultures en milieu de Mayer saccharosé à 5 p. 100 ou en bouillon de viande glucosé à 1 p. 100. Dans les deux cas, les cultures sont filtrées après quinze jours d'étuve à 23°-27° et stérilisées à l'autoclave à 120° pendant cinq minutes.

On ajoute 7 à 10 cent. cubes de ces filtrats aux milieux de cultures. Lorsqu'on remplace l'extrait fécal par le filtrat de cultures de *Mucor* en milieu de Mayer, on voit la fermentation cellulosique ne commencer qu'après trois semaines et le pigment jaune orange être très pâle. Huit jours plus tard, l'attaque n'est pas beaucoup plus prononcée. En réensemencant alors, on voit, au bout de trois semaines, une éphémère et légère désagrégation. Le bacille est très mince, court et non sporulé.

Si, au contraire, on emploie le filtrat de cultures de *Mucor* en bouillon de viande, les résultats sont meilleurs; les cultures deviennent perceptibles au bout d'une dizaine de jours et le microbe est sporulé. Une deuxième attaque n'est obtenue qu'après une période d'incubation de dix jours; il faut ensuite quinze jours d'étuve pour que le fragment de papier soit détruit, et le pigment jaune est très pâle.

De ces essais il ressort que les filtrats de cultures de *Mucor*, si actifs vis-à-vis des levures et de nombreux microbes, ne favorisent pas le développement du *Bacillus cellulosaë dissolvens*. L'action, très légère, du filtrat de culture en bouillon n'est due qu'au bouillon lui-même et l'action, si faible, du filtrat de culture en milieu de Mayer peut être négligée. Nous avons vu qu'il est possible, en effet, d'obtenir une fermentation dans le milieu n° 4 qui ne contient pas d'extrait fécal.

Pour résumer ces recherches sur la composition du milieu de culture, nous dirons que le *Bacillus cellulosaë dissolvens* préfère, à toute autre source d'azote, les produits dégradés qu'il trouve dans l'extrait fécal.

COMPOSITION DE L'EXTRAIT DE MATIÈRES FÉCALES. — Nous avons cherché à connaître la composition de l'extrait fécal indispensable au bon développement du *Bacillus cellulosaë dissolvens* dans les milieux minéraux. Pour éliminer les peptones et les sels qu'on peut trouver dans les extraits aqueux de fèces, nous avons fait un extrait alcoolique de la manière suivante : 25 grammes de

matières sont délayées dans 80 cent. cubes d'alcool à 95°; on évapore rapidement l'alcool à l'étuve à 37° et on reprend le résidu par 100 cent. cubes d'eau distillée. On obtient un liquide trouble qui tient en suspension de nombreuses particules solides. Une partie est stérilisée telle quelle à 110° pendant un quart d'heure; une autre partie, filtrée sur un filtre de papier, reste trouble et est également stérilisée; la dernière partie est stérilisée par filtration à travers une bougie L. 3. Comme les opérations ont été faites rapidement, ce dernier filtrat n'a pas eu le temps de s'oxyder complètement et n'est pas coloré en brun foncé. Nous nous sommes assurée que ces diverses préparations n'étaient pas moins actives que l'extrait aqueux et nous avons pu remarquer qu'avec l'extrait alcoolique filtré à la bougie et pas encore coloré en brun foncé, les cultures sont beaucoup moins bonnes. Elles redeviennent normales si on ajoute un extrait complètement oxydé à l'air.

Nous avons fait sur l'extrait alcoolique limpide et sur l'extrait aqueux les réactions qu'on fait d'ordinaire quand on analyse des fèces, c'est-à-dire que nous avons recherché l'indol, le scatol, l'hydrobilirubine, les pigments biliaires, les acides biliaires et la cholestérine.

Voici quelles réactions nous avons employées et les résultats qu'elles nous ont donnés :

Indol et scatol [45]. — 5 cent. cubes d'extrait sont agités avec 3 cent. cubes d'éther de pétrole; l'éther décanté est additionné de 1 cent. cube de solution alcoolique de paradiméthylamidobenzaldéhyde à 2 p. 100 et de 1 cent. cube d'acide chlorhydrique pur. L'indol doit donner une coloration rouge et le scatol une coloration bleue. Nous ne les avons jamais obtenues. En répétant ces réactions après avoir fait bouillir l'extrait fécal avec de la lessive de soude, nous avons pu, une fois, mettre en évidence du scatol.

Hydrobilirubine [45]. — 10 cent. cubes d'extrait sont additionnés de 3 à 4 gouttes de solution de persulfate de soude à 5 p. 100 et d'assez d'acide acétique au dixième pour obtenir une réaction légèrement acide. On ajoute ensuite au mélange un excès d'acétate de zinc pulvérisé et un volume d'alcool à 95° égal au volume total du liquide. On agite et on laisse en repos pendant quelques heures. Le liquide présente une fluorescence verte plus ou moins vive en présence d'hydrobilirubine. Nous

n'avons obtenu cette coloration qu'avec un seul extrait; elle était, du reste, très faible.

Pigments biliaires [45]. — On verse 1 cent. cube d'extrait dans un tube à essai, on ajoute 5 cent. cubes d'une solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 et de l'eau de baryte en quantité suffisante pour rendre le mélange alcalin, puis on agite vivement. On jette sur un filtre et on lave le précipité avec un peu d'eau distillée. On perce alors le filtre et on fait tomber le précipité dans un tube au moyen de 5 cent. cubes d'alcool à 90° auxquels on ajoute 5 gouttes d'acide chlorhydrique à 22° B. On place le tube dans un bain-marie bouillant pendant une minute, puis l'on examine. Le précipité doit être coloré en vert plus ou moins foncé.

Nous n'avons jamais obtenu cette coloration du précipité; il se dissout dans l'alcool chlorhydrique.

Acides biliaires [13]. — On verse dans un tube à essai 3 cent. cubes d'eau, puis on y laisse couler avec précaution 6 cent. cubes d'acide sulfurique concentré. On agite doucement, sous un courant d'eau, pour refroidir le mélange. Quand celui-ci est bien homogène, on ajoute 6 gouttes d'une solution de lévulose à 10 p. 100, puis 1 cent. cube d'extrait fécal. En présence d'acides biliaires, le liquide prend une teinte rose qui, au bout de dix minutes, devient rose violacé.

Jamais nous n'avons trouvé d'acides biliaires dans l'extrait fécal.

Cholestérine [13]. — 10 cent. cubes d'extrait sont agités avec 3 cent. cubes de chloroforme. Le chloroforme, séparé du liquide aqueux, est mis dans un tube à essai avec 1 cent. cube d'anhydride acétique et 5 cent. cubes d'acide sulfurique pur. Au bout d'une demi-heure, nous avons eu une légère coloration verte. Si on veut qu'elle soit plus intense, il faut opérer sur une plus grande quantité d'extrait, évaporer le chloroforme et dissoudre le résidu d'évaporation dans 1 cent. cube de chloroforme en continuant comme ci-dessus.

Ce n'est pas la cholestérine que contient l'extrait fécal qui favorise le développement du *Bacillus cellulosa dissolvens*, car nous avons incorporé de la cholestérine pure à la solution n° 4 sans qu'il nous ait été possible de le faire pousser. Ce qui lui est indispensable, c'est la substance qui colore l'extrait en brun foncé. En effet la couleur du milieu se modifie pendant la fer-

mentation : brun foncé au début, elle est, à la fin, marron clair, et on voit au fond des tubes et des ballons un précipité fortement coloré, soluble dans l'acide chlorhydrique à 10 p. 100, insoluble dans l'alcool et dans l'éther. L'alcool amylique qui ne décolore pas l'extrait fécal décolore, au contraire, presque entièrement la solution chlorhydrique.

Action de l'eau. — Les bandes de papier humectées de solution nutritive dont nous nous sommes servie pour les isoléments nous ont montré que les microbes se développent surtout au fond du tube, là où il y a quelques gouttes de liquide. A cause de cela nous avons supposé que les microbes ne poussaient bien que dans une grande quantité de solution nutritive et nous avons vérifié cette hypothèse avec le *Bacillus cellulosa dissolvens*. Nous avons préparé des milieux de culture qui contenaient une bande de papier dont la moitié inférieure seule plongeait dans la solution et nous les avons largementensemencés. Nous les avons mis à l'étuve en prenant la précaution de ne plus les agiter. Au bout de quelque temps la partie immergée était jaune orange et se désagrégeait au moindre choc; l'attaque du papier s'arrêtait au niveau du liquide, et la partie supérieure restait intacte, jusqu'au moment où elle était plongée à son tour dans la solution.

*Action du Bacillus cellulosa dissolvens
sur les hydrates de carbone.*

Nous avons, dans notre milieu de culture, remplacé la cellulose par différents hydrates de carbone : on prépare des solutions concentrées de sucres réducteurs stérilisées en ne dépassant pas 105° et titrées par la méthode de G. Bertrand [11] pour connaître exactement leur teneur en sucre; on prépare également des solutions concentrées, stériles, d'alcools et d'hydrates de carbone condensés. On leur ajoute une quantité suffisante de solution nutritive pour que leur concentration soit de 1, 2, 3, 4, 5 p. 100 et que le volume total ne dépasse pas 5 cent. cubes.

Après deux jours d'étuve, pour contrôler la stérilité des milieux, onensemence largement avec une culture du *Bacillus cellulosa dissolvens* en pleine fermentation.

Voici les hydrates de carbone que nous avons essayés :

Pentoses : Arabinose, xylose.

Hexoses : Glucose, lévulose, galactose.

Bioses : Saccharose, maltose, lactose, cellose.

Alcools : Glycérine, mannite, dulcite.

Hydrates de carbone condensés : Inuline, amidon soluble.

Les cultures sont restées un mois et demi à l'étuve et le milieu n'a jamais été trouble; il n'y a pas eu de dégagement gazeux et l'on a vu au microscope que le *Bacillus cellulosa dissolvens* n'a pas proliféré. Il n'attaque donc que la cellulose, les autres hydrates ne pouvant lui servir de source de carbone. Même en présence de cellulose il ne les fait pas fermenter : du glucose ajouté à notre milieu de culture ordinaire est resté intact tandis que le papier a été désagré.

Recherche d'une cellulase.

Nous ne connaissons que les recherches de Pringsheim sur les cellulases microbiennes et celles qui ont pour but de mettre en évidence autour des colonies une zone claire due à la sécrétion d'une enzyme par les bactéries aérobies.

Pringsheim [13] n'a pas trouvé de diastases dans ses milieux de culture. Selon lui, la cellulase microbienne est un endoferment et les bactéries cellulosiques sécrètent non seulement une cellulase, mais une cellobiase, car il a pu préparer les osazones du cellobiose et du glucose formés pendant la fermentation. Mais ses recherches, pour n'avoir pas été faites avec des espèces pures, mais avec un mélange de bactéries pouvant sécréter diverses diastases, n'ont qu'une valeur relative.

Comme il nous a été impossible de constater la plus petite zone claire (là où le papier est attaqué, on trouve des microbes), nous avons recherché une cellulase dans la solution nutritive. Pour tuer le *Bacillus cellulosa dissolvens*, la chloropicrine [12] nous a servi d'antiseptique. Elle présente pour nous deux avantages : celui de n'avoir aucune action sur les enzymes, et, par sa solubilité dans l'eau, de baigner tous les débris de papier imprégnés de microbes.

Nous avons opéré ainsi : nous avons préparé une culture avec 1 gramme de cellulose et 100 cent. cubes de liquide

nutritif. Lorsque le papier était entièrement jaune orange et la fermentation très active, nous avons saturé le liquide avec de la chloropierine. Nous avons fait des prises d'essai trois, cinq et dix jours après. Nous avons prélevé stérilement 30 cent. cubes de liquide ainsi que des débris de papier. Nous avons centrifugé dix minutes dans des tubes stériles pour débarrasser la solution des fibrilles et des microbes. Après décantation du liquide qui surnage, nous avons lavé le résidu avec de l'eau physiologique et nous avons centrifugé de nouveau durant dix minutes. Une fois l'eau physiologique décantée nous avions un liquide, dans lequel on pouvait rechercher une cellulase soluble, et des débris de papier imprégnés de microbes à morphologie inchangée par la chloropierine. Lorsque le *Bacillus cellulosaë dissolvens* était tué par la chloropierine, ces débris de papier ne donnaient plus de cultures. Il nous ont donc servi de témoins.

Avec les liquides centrifugés et les résidus de fermentation nous avons fait les expériences suivantes :

1° Nous avons plongé un fragment de papier stérile dans 5 cent. cubes de liquide centrifugé et nous avons ajouté 1 cent. cube de toluène.

2° Nous avons additionné à 5 cent. cubes de milieu ordinaire 5 cent. cubes de liquide centrifugé et dans certains tubes nous avons fait le vide pour nous rapprocher des conditions habituelles de culture. Chaque tube contenait du toluène.

3° Nous avons ajouté des résidus de fermentation au milieu de culture habituel dans des conditions aérobies et anaérobies. Les tubes aérobies contenaient du toluène, les tubes anaérobies nous servaient de témoins.

Le *Bacillus cellulosaë dissolvens* n'est tué par la chloropierine qu'après dix jours. Dans les cultures anaérobies faites avec les débris de papier qui ont subi pendant trois et cinq jours l'action de la chloropierine, le *Bacillus cellulosaë dissolvens* se développe encore. Le morceau de papier devient jaune orange, il y a formation de gaz, et par un examen microscopique on s'aperçoit que les fibrilles sont recouvertes de bacilles. Après dix jours on n'a plus de fermentation, mais dans aucun tube, aérobie ou anaérobie, on ne voit d'action diastasique sur la cellulose.

La cellulase sécrétée par le *Bacillus cellulosaë dissolvens* ne

diffuse pas dans les liquides de culture, c'est un endo-ferment qui n'agit que lorsque le microbe vivant adhère à la cellulose elle-même.

Pouvoir pathogène.

Afin d'éviter l'injection de carbonate de calcium à l'animal, nous préparons des cultures en milieu non carbonaté. Vingt-quatre heures après le début de la fermentation, le tube est agité vigoureusement pour dilacérer le papier en fibrilles et le mettre en suspension. Nous injectons 3 cent. cubes du liquide agité dans la cuisse d'un cobaye de 300 grammes. L'animal réagit très peu. Au point d'inoculation on ne voit qu'une légère induration qui disparaît en quelques jours.

Le *Bacillus cellulosæ dissolvens* n'est donc pas pathogène.

Ce qui le caractérise, c'est son action spécifique sur la cellulose.

CHAPITRE III

CARACTÉRISATION ET DOSAGE DES PRODUITS DE DÉCOMPOSITION DE LA CELLULOSE PAR LE *BACILLUS CELLULOSÆ DISSOLVENS*

Nous conservons pour les dosages notre milieu nutritif contenant de l'extrait fécal, parce qu'il est le plus favorable au développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens*. Mais nous y ajoutons une quantité exactement connue de cellulose. Nous n'incorporons jamais plus de 1 p. 100 de cellulose desséchée à 100° afin que les produits solubles de fermentation ne modifient pas, de manière sensible, la composition du milieu de culture.

Nous nous servons de ballons munis d'un robinet à vide dont le volume est égal à deux fois et demie le volume du liquide qu'ils doivent contenir. Le vide étant fait dans ces ballons de telle manière que la pression d'air ne dépasse pas 2 à 4 millimètres de mercure, les gaz de la fermentation ne sont jamais à une pression supérieure à la pression atmosphérique, ce dont nous nous assurons d'ailleurs au moment de l'analyse des gaz. Cela nous est une preuve que pendant la fermentation il n'y a pas eu de rentrée d'air, ni de perte de gaz.

Nous avons réalisé une dizaine de fermentations avec des quantités différentes de cellulose. A certaines d'entre elles nous n'avons pas ajouté de carbonate de calcium. Quelques cultures ont été faites en vue de recueillir tous les produits de fermentation et d'établir un bilan, d'autres afin d'obtenir les produits solubles pour en déterminer exactement la nature.

Nous donnerons deux analyses. La première est faite avec

une culture ne contenant pas de carbonate de calcium, et l'autre avec une culture en contenant.

Les résultats de la première ne sont pas très favorables, car la quantité de cellulose dissoute est faible et, par conséquent, la détermination exacte de tous les produits est très difficile.

Elle présente cependant un certain intérêt. On voit en effet, en comparant les résultats qu'elle donne à ceux de la deuxième analyse, qu'il disparaît 2 fois et demie moins de cellulose dans les cultures qui ne contiennent pas de carbonate de calcium que dans celles qui en contiennent, et que le rapport des gaz et le rapport des acides varie peu dans l'une et dans l'autre.

PREMIÈRE ANALYSE.

On prend 1 gramme de cellulose séchée à 100° et 100 cent. cubes de solution nutritive sans carbonate de calcium. La fermentation commence après six jours et dure dix jours. Le papier devient jaune orange, le dégagement gazeux est régulier et ne commence à diminuer que deux jours avant l'arrêt de la fermentation. Six jours après cet arrêt on extrait les gaz. Comme la culture a été faite sans carbonate de calcium, on ne trouvera évidemment que les gaz qui proviennent de la fermentation cellulosique.

Analyse des gaz :

Température du mercure	14°5
Pression atmosphérique	752 mm. 5
Volume du gaz recueilli.	26 c. c. 4

Recherche du gaz carbonique :

Prise d'essai	18 c. c. 6
KOH + H ² O	9 c. c. 85
	8 c. c. 75
	ou 47,04 p. 100 de CO ²
Pyrogallol (pas d'oxygène)	8 c. c. 75

Analyse eudiométrique :

Prise d'essai	2 c. c. 93
Oxygène	12 c. c. 3
	15 c. c. 23
Après combustion	11 c. c. 2
Après contraction	4 c. c. 03

La contraction correspond à 2 c.c. 59 d'hydrogène. Il reste 0 c.c. 24 de gaz non déterminé qui est probablement de l'azote, car, après avoir ajouté de l'eau et de la potasse, le volume ne diminue

pas. Il ne s'est donc pas formé de gaz carbonique pendant la fermentation.

Dans cette analyse il y a 91,8 p. 100 d'hydrogène, soit pour les gaz retirés du ballon, 48,51 p. 100.

Une deuxième analyse eudiométrique nous a donné 48,16 p. 100 d'hydrogène, soit en moyenne 48,33 p. 100.

Les 26 c. c. 4 de gaz recueillis sont donc formés de :

47,04 p. 100 de gaz carbonique, soit 12 c. c. 41.

48,33 p. 100 d'hydrogène, soit 12 c. c. 75.

4,63 p. 100 d'azote qui provient de l'air atmosphérique laissé dans le ballon.

Le poids des 12 c. c. 41 de gaz carbonique est :

$$1,293.d.\frac{H}{760}\frac{V}{1+\alpha t}=1,293.1,529.\frac{752,5}{760}.\frac{12,41}{1+\frac{14,5}{273}}=0\text{ gr. }023.$$

La même formule donne pour l'hydrogène 0 gr. 001.

Il nous reste maintenant à déterminer le poids du résidu de fermentation, à étudier le pigment jaune et à faire l'analyse des aldéhydes, des alcools et des acides éventuels.

Poids du résidu de fermentation : On filtre le liquide de culture sur un filtre séché à 100° et taré. Le liquide est mis de côté pour les opérations suivantes. Il est parfaitement limpide et ne contient pas de corps microbiens en suspension. Ces derniers sont pesés avec le résidu de fermentation.

Le résidu est lavé à l'eau, puis, pour dissoudre le pigment, à l'alcool à 95°. On le sèche à 100° et on le pèse.

Tare du filtre	0 gr. 701
+ résidu.	1 gr. 526
Poids du résidu de fermentation.	0 gr. 825

Pendant la fermentation il a disparu :

$$1\text{ gramme} - 0,825 = 0\text{ gr. }175\text{ ou }17,5\text{ p. }100.$$

Pigment : L'alcool coloré en jaune par le pigment a été évaporé dans le vide, mais à la fin de l'évaporation le pigment était décomposé et nous n'avons retrouvé que des traces d'une poudre blanchâtre avec laquelle il était impossible de faire des réactions.

Analyse des produits solubles dans l'eau : Le liquide de culture filtré est acide au tournesol : 10 cent. cubes sont neutralisés en présence de phtaléine par 1 c. c. 2 de lessive de soude N/10. Il ne réduit pas le réactif cupro-potassique.

Produits volatils non acides : Le liquide est neutralisé et distillé. On

recueille les 25 premiers cent. cubes qui sont redistillés afin d'obtenir 10 cent. cubes riches en produits volatils. 1 cent. cube de ce distillat réduit le bichromate sulfurique et la teinte obtenue est celle que donnent dans les mêmes conditions 2 cent. cubes de solution d'alcool éthylique au millième.

Il y a donc dans les 10 cent. cubes, à supposer qu'il ne s'y trouve

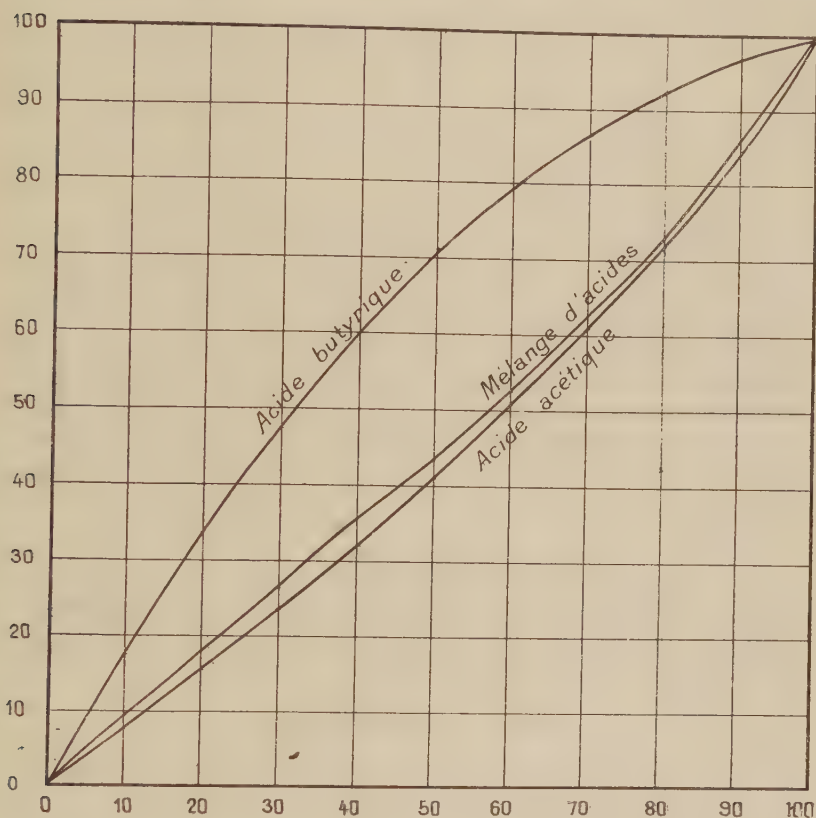


FIG. 7.

pas d'autre réducteur que l'alcool éthylique, 2 centigrammes de cet alcool, quantité trop faible pour se prêter à la recherche d'autres corps volatils.

Acides volatils : Le résidu de distillation en milieu neutre est acidifié par de l'acide tartrique en léger excès. On amène son volume à 110 cent. cubes et on opère selon les indications de Duclaux pour la recherche et le dosage des acides volatils. Chacune des prises de 10 cent. cubes est neutralisée par de l'eau de chaux saturée, en présence de phtaléine. Il faut 28 c.c. 8 de cette eau de chaux pour neutraliser 10 cent. cubes d'acide sulfurique N/10.

Voici les chiffres obtenus :

PRISES D'ESSAI en centimètres cubes	EAU DE CHAUX en centimètres cubes	ACIDES DISTILLÉS p. 100
10	2,8	9,7
20	3,2	18
30	7,6	26,7
40	10,2	35,4
50	12,4	43,05
60	15,2	52,7
70	18	62,5
80	21	72,9
90	24,8	86
100	28,8	100

Ces chiffres permettent de construire la courbe ci-dessus.

On voit qu'elle est comprise entre celles des acides acétique et butyrique, et comme, de plus, l'odeur butyrique est très nette au début de la distillation, il est évident qu'on se trouve en présence d'un mélange d'acides acétique et butyrique.

Par l'étude des tables de Duclaux (après les avoir préalablement complétées) on peut connaître la proportion dans laquelle sont mélangés ces acides. Au début de la distillation (30, 40 cent. cubes) on a une partie d'acide butyrique pour sept parties d'acide acétique; à la fin de la distillation (50, 60, 70 cent. cubes) une partie d'acide butyrique pour onze parties d'acide acétique; la moyenne est donc de 1 p. 9,2.

Les 28 c.c. 8 d'eau de chaux employés à neutraliser les acides volatils représentent 1 c.c. 063 d'acide N/10. Si, pour faciliter les calculs, on suppose qu'on n'a que de l'acide acétique, l'erreur faite ainsi étant négligeable, on obtient, après les corrections indiquées par Duclaux, 0 gr. 008 d'acide acétique.

BILAN DE FERMENTATION

Poids de cellulose disparue pendant la fermentation. 0 gr. 175

Poids des corps retrouvés par l'analyse :

Gaz carbonique	0 gr. 023
Hydrogène	0 gr. 001
Alcool	0 gr. 02
Acide.	0 gr. 008
Total	0 gr. 052
	ou 29,71 p. 100

DEUXIÈME ANALYSE.

3 grammes de cellulose sont mis en fermentation dans 300 cent. cubes de solution nutritive additionnée de 0 gr. 60 de carbonate de calcium.

La fermentation a duré dix-neuf jours. Le ballon a été agité matin et soir pour que le milieu conserve sa réaction neutre.

La coloration brun foncé du liquide s'est éclaircie. A la fin de la fermentation on voit au fond du ballon un précipité fortement coloré.

Analyse des gaz :

Pression atmosphérique	750 mm.
Température du mercure.	25°

On recueille 290 cent. cubes de gaz composés de 56,1 p. 100 de gaz carbonique, soit 162 c. c. 69 et de 36,11 p. 100 d'hydrogène, soit 104 c. c. 71. On a un résidu de 7,7 p. 100 d'azote.

162 c. c. 69 de gaz carbonique pèsent	0 gr. 2907
104 c. c. 71 d'hydrogène pèsent.	0 gr. 0085

Poids du résidu de fermentation : Le résidu de fermentation est non seulement lavé à l'eau et à l'alcool, mais à l'acide chlorhydrique à 10 p. 100 pour dissoudre l'excès de carbonate de calcium ainsi que le précipité brun foncé. On termine par des lavages à l'eau jusqu'à ce que la réaction du chlore disparaisse.

Tare du filtre.	0 gr. 702
+ résidu.	2 gr. 690
Poids du résidu de fermentation.	1 gr. 988

Pendant la fermentation il a disparu :

3 grammes — 1 gr. 988 = 1 gr. 012 ou 33,7 p. 100
soit 2,5 fois plus qu'en l'absence de carbonate de calcium.

Pigment : L'alcool est distillé dans le vide. Malgré la rapidité de l'opération, le pigment s'est décomposé en grande partie. On reprend par quelques centimètres cubes d'alcool les quelques gouttes huileuses, brunâtres, qui se trouvent au fond du ballon. L'alcool est évaporé dans le vide et on pèse le résidu. On trouve 13 milligr. 5 de pigment, poids évidemment très inférieur au poids réel.

Ce pigment est soluble dans l'alcool, le chloroforme, l'éther, le sulfure de carbone, la benzine et l'acétone. Il les colore en jaune.

Analyse des produits solubles dans l'eau : Le liquide de culture est neutre au tournesol et ne réduit pas le réactif cupro-potassique.

Produits volatils non acides : On distille 100 cent. cubes du liquide de culture. Le distillat exhale une odeur nauséabonde de matières organiques en décomposition et il est légèrement alcalin au tournesol. On le redistille après addition de quelques gouttes d'acide sulfurique et on recueille 37 cent. cubes qui contiennent, en suppo-

sant que c'est uniquement de l'alcool éthylique, 0 gr. 082 d'un corps volatil qui réduit le bichromate sulfurique et donne avec le chlorure de benzoyle du benzoate d'éthyle.

Acides volatils : Avant de rechercher les acides volatils on alcalinise légèrement le liquide et on le débarrasse de tout corps réducteur, par un entraînement à la vapeur d'eau. On l'acidifie ensuite par un léger excès d'acide tartrique. On laisse déposer les sels de calcium et on filtre. On a alors 200 cent. cubes de liquide. On en prend 100 cent. cubes qu'on amène au volume de 110 cent. et on opère suivant la méthode de Duclaux.

24 cent. cubes de l'eau dont on se sert neutralisent 10 cent. cubes d'acide sulfurique N/10.

Voici les chiffres qu'on obtient :

PRISES D'ESSAI en centimètres cubes	EAU DE CHAUX en centimètres cubes	ACIDES DISTILLÉS p. 100
10	3,9	8
20	8	16,4
30	12,2	25,1
40	16,6	34,2
50	21,1	43,5
60	25,7	52,9
70	30,6	63
80	36	74,2
90	41,9	86,4
100	48,5	100

Il faut doubler la quantité d'eau de chaux employée à la neutralisation des acides, puisqu'on a 200 cent. cubes de liquide. Cela nous donne 97 cent. cubes d'eau de chaux.

On peut avec les chiffres trouvés construire la courbe ci-contre.

A l'aide des tables de Duclaux, on peut conclure de ces analyses qu'on se trouve en présence d'un mélange de 1 partie d'acide butyrique et de 10 parties d'acide acétique.

Les 97 cent. cubes d'eau de chaux nécessaires pour saturer les acides se répartissent donc de la manière suivante :

8 c. c. 80 pour l'acide butyrique, soit après correction. 9 cent. cubes
88 c. c. 20 pour l'acide acétique, soit après correction. 100 cent. cubes

Poids d'acide acétique 0 gr. 275
Poids d'acide butyrique. 0 gr. 033

Poids du gaz carbonique dégagé par l'acide acétique . . 0 gr. 10
Poids du gaz carbonique dégagé par l'acide butyrique. . 0 gr. 008

Total 0 gr. 108

Poids du gaz carbonique produit par la décomposition de la cellulose :

$$0 \text{ gr. } 2907 - 0 \text{ gr. } 108 = 0 \text{ gr. } 4827.$$

BILAN DE FERMENTATION

en grammes

Poids de cellulose disparue pendant la fermentation 1,012

Poids des corps retrouvés par l'analyse :

Acide acétique	0,275
Acide butyrique	0,033
Alcool éthylique	0,082
Gaz carbonique	0,1827
Hydrogène	0,0085
Pigment	0,0135

0,5947

ou 58,76 p. 100

BILAN DE CARBONE

en grammes

contenant 0,400

contenant	0,110
—	0,018
—	0,0428
—	0,0498
»	»
»	»

0,2206

ou 55,45 p. 100

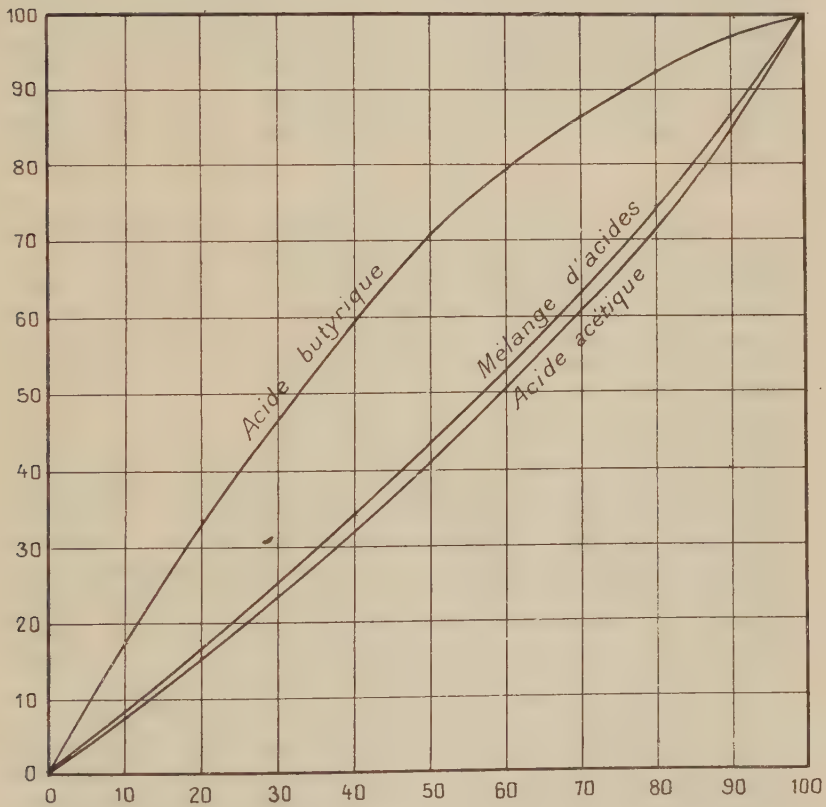


FIG. 8.

Les autres analyses que nous avons faites ne nous ont pas donné de meilleurs résultats. Les produits volatils ne représentent pas plus de 55 p. 100 du carbone disparu pendant la

fermentation. Les autres 45 p. 100 ne sont pas faciles à retrouver. Une grande partie du pigment étant décomposée pendant son extraction, on ne connaît ni son poids exact, ni sa teneur en carbone, mais le pigment ne représente, à lui seul, que quelques centièmes du carbone manquant. La nature et le poids des corps volatils alcalins et du précipité brun foncé n'ayant pas été déterminés, il se peut qu'ils contiennent du carbone provenant de la cellulose. Mais la quantité de carbone qu'on pourrait ainsi retrouver est évidemment très faible et ne suffit pas à expliquer pourquoi on ne retrouve que 55 p. 100 du carbone mis en fermentation. A cause de cela, nous avons pensé que la partie du carbone non retrouvée pouvait être engagée dans des corps solubles non volatils tels que l'acide lactique ou des produits d'hydrolyse intermédiaires entre le cellose et la cellulose, puisque le liquide de fermentation ne réduit pas la liqueur cupro-potassique. C'est pourquoi nous avons fait les recherches suivantes :

RECHERCHE DE L'ACIDE LACTIQUE : Le liquide de fermentation débarrassé des acides volatils est concentré et agité avec de l'éther saturé d'eau. L'éther est acide au tournesol et donne, avec l'acide sulfurique et la solution alcoolique de codéine à 5 p. 100, la coloration brune qui caractérise l'acide lactique. Mais il n'est pas possible de faire cristalliser du lactate de zinc. L'acide lactique n'existe donc qu'à l'état de traces.

RECHERCHE DES PRODUITS D'HYDROLYSE DE LA CELLULOSE : Nous avons pensé que ces corps, solubles dans les milieux de culture, seraient précipités par l'alcool et qu'en les transformant ensuite en sucre réducteur il nous serait possible de les identifier.

On évapore jusqu'à consistance sirupeuse 1.000 cent. cubes de liquide de fermentation débarrassé des produits volatils. Le phosphate de potassium et le chlorure de sodium cristallisent en partie. On filtre et on additionne le filtrat d'une quantité suffisante d'alcool à 95° pour obtenir un liquide alcoolique à 60°. Il se forme un précipité qui pèse 0 gr. 30 et contient 0 gr. 084 de matière organique. Le précipité est soumis à l'hydrolyse par de l'acide chlorhydrique à 10 p. 100, pendant dix heures, dans un bain-marie bouillant. Après ce temps, on trouve 1 milligramme de sucre réducteur. Cette quantité est très faible, il n'existe donc que des traces de produits d'hydrolyse précipitables par l'alcool, qui ne représentent pas les 45 p. 100 de carbone manquants dans l'analyse faite sur 300 cent. cubes de liquide.

Nous pensons qu'il doit exister des saccharides solubles dans l'alcool, saccharides qui sont probablement assimilables par

l'organisme. Le *Bacillus cellulosa dissolvens* jouerait, de ce fait, un rôle très important dans la digestion de la cellulose, puisqu'il donnerait ainsi non seulement des acides assimilables, mais des saccharides également assimilables. Nous n'avons pu déceler ceux-ci parce que nous avons opéré sur des quantités de liquide trop faibles. Comme il est très difficile de retrouver ces saccharides dans un milieu de culture complexe, nous nous proposons de les rechercher, en faisant fermenter plusieurs centaines de grammes de cellulose.

Nous exposerons maintenant quelques recherches faites sur la solution alcoolique de pigment, sur les corps volatils en milieu neutre et sur les acides volatils, en faisant remarquer que pour ces derniers nous n'avons jamais trouvé plus d'une partie d'acide butyrique pour 9,2 parties d'acide acétique et que souvent même la quantité d'acide butyrique était beaucoup plus faible.

RÉACTIONS DE LA SOLUTION ALCOOLIQUE DE PIGMENT :

Quelques centimètres cubes sont traités	par NaOH	Précipité blanchâtre.
—	à chaud par NH_3 . .	0
—	par HCl	La couleur devient un peu plus accentuée.
—	par SO^2H^2 . . .	La couleur devient un peu plus accentuée.
—	par NO^2H	Couleur rose sale.
—	par I + KI	0
—	par Fe^2Cl^6	Couleur brune assez foncée.

DÉTERMINATION DE LA NATURE DES CORPS VOLATILS EN MILIEU NEUTRE :

On réunit les distillats en milieu neutre provenant de plusieurs fermentations, et on les rectifie. On obtient plusieurs centimètres cubes de liquide dont on sépare l'eau par du carbonate de potassium sec et pulvérisé. On obtient environ 2 centimètres et demi d'un corps dont on prend la densité et le point d'ébullition.

Densité	0,815
Point d'ébullition.	78-80°

Quelques gouttes sont oxydées par le bichromate de potassium et l'acide sulfurique. On obtient par distillation un acide qui donne les réactions de l'acide acétique : précipité avec le nitrate d'argent et coloration rouge avec le perchlorure de fer.

Tous ces caractères permettent de conclure que le corps étudié est de l'alcool éthylique. Il ne contient pas d'aldéhydes, car il ne réduit pas la liqueur cupro-potassique, le nitrate d'argent ammoniacal et ne recolore pas le réactif de Schiff.

DÉTERMINATION DE LA NATURE ET DOSAGE DES CORPS VOLATILS EN MILIEU ACIDE : On réunit les distillats en milieu acide provenant de plusieurs fermentations.

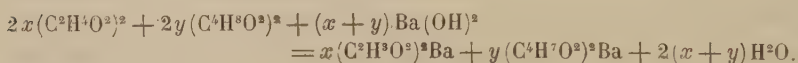
Une partie, neutralisée par de la lessive de soude, est concentrée. Elle donne les réactions de l'acide acétique et la réaction d'Aguhlon [43] qui caractérise l'acide butyrique.

Une autre partie est neutralisée par de l'eau de baryte. On fait cristalliser les sels de baryum. On les sèche, on les reprend par l'eau et on les fait cristalliser à nouveau.

On prend 0 gr. 25 du mélange de sels de baryum. On précipite le baryum par de l'acide sulfurique :

On obtient 0 gr. 223 qui contiennent 0 gr. 131 de baryum.

Ne connaissant ni le poids d'acide acétique ni le poids d'acide butyrique qui ont formé les 0 gr. 25 d'acétate et de butyrate de baryum, on peut écrire la réaction sous la forme suivante :



On a pour déterminer x et y les deux données 0,25 et 0,131.

On trouve que le rapport en poids de $\frac{x}{y}$ est égal à $\frac{8}{1}$ et que le rapport en volume est égal à $\frac{11.8}{1}$.

Les chiffres de l'analyse pondérale sont donc voisins de ceux fournis par la distillation suivant la méthode de Duclaux.

Nous indiquerons, enfin, qu'une de nos cultures ayant été contaminée, nous avons vu disparaître en trente-six jours 90,87 p. 100 des 10 grammes de cellulose mis en fermentation. Si on se rappelle que dans les cultures pures il disparaît en dix-neuf jours 1 gramme environ de cellulose, on voit que dans les cultures impures il en disparaît cinq fois plus. Le pigment est décomposé par la flore associée au fur et à mesure de sa formation, ce qui permet au *Bacillus cellulosa dissolvens* de continuer à vivre sur la fibre cellulosique.

Nous n'avons pas réussi à isoler les espèces qui permettent au *Bacillus cellulosa dissolvens* d'exercer ainsi son action spécifique sur la cellulose. Mais nous croyons intéressant de signaler ce phénomène. Il explique pourquoi, dans les premières cultures, le papier ne présente pas toujours la coloration jaune orange si caractéristique. Il nous donne lieu de croire aussi qu'une grande quantité de cellulose est décomposée rapidement dans le tube digestif par les associations microbiennes,

les produits de fermentations cellulositiques servant d'aliments à d'autres bactéries.

On a, du reste, déjà signalé l'importance du rôle joué par la cellulose dans la fixation d'azote et dans la formation d'ammoniaque par les bactéries du sol. Nous ne citerons que les expériences faites avec des associations d'espèces pures. M. Beth [104] constate que les *Azotobacters* fixent de l'azote quand on ne leur donne que de la cellulose comme source d'hydrate de carbone et qu'on les associe au *Bacillus rossicus*, aux *Bacterium fimi* et *flavigenum*. Pour Hutchinson et Clayton le mucilage pectique formé par le *Spirochæta cytophaga* peut servir de source de carbone aux bactéries nitrifiantes. Enfin Groenewègë étudie l'action des bactéries dénitrifiantes vivant en symbiose avec les *Bacillus cellaresolvens* α , β et γ .

CONCLUSIONS

Des recherches que nous avons résumées dans la première partie au chapitre II, il ressort que la cellulose est désagrégée non seulement dans le tube digestif des animaux, mais encore dans celui de l'homme, et qu'en particulier chez ce dernier la cellulose des légumes tendres tels que la carotte et le chou blanc disparaît presque intégralement.

La cause de cette dissolution doit être attribuée à des micro-organismes dont aucune espèce jusqu'à présent n'avait été isolée de la flore intestinale de l'homme.

Nous avons réussi à isoler une espèce anaérobie stricte, le *Bacillus cellulosa dissolvens*, n. sp. dans 60 p. 100 des cas étudiés.

Cette espèce est difficile à cultiver. Elle ne pousse normalement que dans les milieux où elle trouve une source d'azote très dégradée comme celle que contient un extrait de matières fécales. Elle est très résistante à la chaleur. Sa spore n'est tuée qu'après avoir été maintenue quarante-cinq à cinquante minutes à l'ébullition et résiste dix jours à l'action de la chloropicroline à saturation (0,16 p. 100).

Parmi les produits de désagrégation de la cellulose, nous avons trouvé du gaz carbonique, de l'hydrogène, de l'alcool éthylique, des acides acétique et butyrique et un pigment jaune, lesquels ne représentent que 60 p. 100 environ de la cellulose mise en fermentation. Nous avons pu déceler aussi des traces d'acide lactique et de produits d'hydrolyse précipitables par l'alcool. Enfin, il doit exister des saccharides solubles dans l'alcool que nous nous proposons de déterminer dans des recherches ultérieures.

On peut attribuer au *Bacillus cellulosa dissolvens*, qui, dans le

milieu intestinal, est dans d'excellentes conditions de culture, un rôle important dans la digestion de la cellulose. En effet, on observe qu'à l'état pur, il désagrège, en seize jours, 1 gramme environ de cellulose, tandis qu'il en désagrège 5 fois plus lorsqu'il est en association avec d'autres espèces microbiennes. Comme, évidemment, c'est le cas dans le tube digestif, où la flore intestinale est des plus riches, il y désagrège rapidement, selon toute vraisemblance, la cellulose des aliments ingérés.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] ABDERHALDEN (Em.), Weitere Untersuchungen über den Stickstoffwechsel. *Zeit. phys. Chem.*, 1915-1916, **96**, p. 1.
- [2] ACREE (S. F.), Destruction of wood and pulp by fungi and bacteria. *Pulp and Paper Mag.*, 1919, **17**, p. 569.
- [3] ALBRECHT (P. G.), Chemical Study of several marine mollusks of the pacific coast. *Journ. Biol. Chem.*, 1920, **45**, p. 395.
- [4] ALEXANDROWICZ (J. S.), Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. Zur Kenntnis der Zellulose und des zelluloselösenden Fermentes im Hepatopancreas der Schnecke (*Helix pomatia*). *Arch. ges. Physiol.*, 1913, **150**, p. 57.
- [5] AMES (A.), A new wood-destroying Fungus. *Botan. Gaz.*, **55**, p. 397.
- [6] ANKERSCHMIT, Untersuchungen über die Bakterien im Verdauungskanal des Rindes. *Centr. f. Bakt.*, Abt. I, 1905, **39**, p. 359, 574, 687; 1906, **40**, p. 100.
- [7] BARANY (R.), Ueber ein neues zellulosereiches Brot und seine Verwendung bei Darmträgheit, Fettleibigkeit und Diabetes. *Wiener med. Woch.*, 1902, n° 9, p. 411.
- [8] BEIJERINCK, L'influence des microbes sur la fertilité du sol. *Arch. néerl. des sciences*, 1904, 2^e série, **9**, p. VIII.
- [9] BERGMAN (P.), Studien über die Digestion der Pflanzenfresser. *Skand. Arch. Physiol.*, 1906, **18**, p. 119.
- [10] BERTHELOT (M.), Remarques sur la fermentation forménique. *C. R. Ac.*, 1889, **109**, p. 841. *Bull. Soc. Chim.*, 1890, **3**, p. 331.
- [11] BERTRAND (G.), Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Chim.*, 1906, **35**, p. 1285.
- [12] BERTRAND (G.) et M^{me} ROSENBLATT, Action de la chloropicrine sur quelques fermentations bactériennes. *C. R. Ac.*, 1920, **170**, p. 1468.
- [13] BERTRAND (G.) et M^{me} ROSENBLATT, La chloropicrine agit-elle sur les ferments solubles? *C. R. Ac.*, 1920, **171**, p. 137.
- [14] BERTRAND (G.) et THOMAS (P.), *Guide pour les manipulations de chimie biologique*. H. Dunod et E. Pinat, édit., Paris, 1919.
- [15] BIDWELL (G. L.), Report on crude fiber. *J. Assoc. off. Agr. Chemists*, 1921-1922, **5**, p. 421.
- [16] BIDWELL (G. L.) et WALTON (G. P.), The determination of crude fiber. *J. Assoc. off. Agr. Chemists*, 1916, **2**, p. 32.
- [17] BIEDERMANN et MORITZ, Ueber ein zelluloselösendes Enzym im Leberssekret der Schnecke (*Helix pomatia*). *Arch. ges. Physiol.*, 1898, **73**, p. 249.
- [18] BREDEMANN, Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. Mit besonderer Berücksichtigung des Stickstoffbildungsvermögens dieser Spezies. *C. f. Bakt.*, Abt. II, **23**, p. 385.

- [18] BROWN (H. T.), On the search for a cellulose dissolving (cyto-hydrolytic) enzyme in the digestive tract of certain grain-feeding animals. *J. Chem. Soc.*, 1892 (1), **61**, p. 352.
- [19] CARBONE (D.), Sulla decomposizione aerobica della cellulosa. *Bull. Soc. Med. Chim.*, 1911.
- [20] CHOUKEVITCH (J.), Flore bactérienne du gros intestin du cheval. *Ann. Inst. Pasteur*, 1911, **25**, p. 247, 345.
— La flore microbienne du gros intestin des bovidés. *Ann. Inst. Pasteur*, 1913, **27**, p. 246, 307.
- [21] CLARKE (E. D.) et SCALES (F. M.), Enzymes of a cellulose-destroying fungus from the soil, *Penicillium pinophilum*. *U. S. Dept. Agric. Wash. D. C. Proc. Soc. Biol. Chem.*, 1915. *J. Biol. Chem.*, 1916, **24**, p. xxxi.
- [22] CROSS et BEVAN. *Cellulose : an outline of the chemistry of the structural Elements of Plants*, London, 1895.
- [23] CRUZIUS, Versuch mit Mastochsen. *Chem. Ackersmann*, 1860, p. 247.
- [24] DEGTIAREFF, cité par ZUNTZ, Gesichtspunkte zum kritischen Studium der neueren Arbeiten auf dem Gebiete der Ernährung. *Landw. Jahrb.*, 1879, **8**, p. 55.
- [25] DEHÉRAIN (P. P.), Sur la fabrication du fumier de ferme. *C. R. Ac.*, 1884, **98**, p. 377.
- [26] DISTASO (A.), Sur un microbe qui désagrège la cellulose (*Bacillus cellulose desagregans* n. sp.). *C. R. Soc. Biol.*, 1911, **70**, p. 395.
- [27] DMOSCHOWSKI (R.) et TOLLENS (B.), Ueber eine Methode der quantitativen Zellulosebestimmung. *Journ. Landw.*, 1910, **58**, p. 1.
- [28] DOPTER et SACQUÉPÉE. *Précis de bactériologie*, 2^e édition. Baillières et fils, éditeurs, Paris.
- [29] ELLENBERGER (W.), Zur Frage der Zelluloseverdauung. *Zeit. Physiol. Chemie*, 1915, **96**, p. 237.
- [30] ELLENBERGER (W.) et HOFMEISTER (V.), Ueber die Verdauungssäfte und die Verdauung des Pferdes. *Archiv f. Thierheilkunde*, 1881, **10**, p. 328, 427; 1885, **11**, p. 141, 381; 1886, **12**, p. 332.
- [31] ELLENBERGER (W.) et WAENTIG (P.), Neue Versuche mit Holzmehlmischfutter. *Berl. tier. Woch.*, 1918, **34**, p. 493.
- [32] ENZMANN, Kritische Betrachtungen über die gegenwärtigen Verfahren, die Wissenschaft von der Ernährung tierischen Organismen vom Standpunkte der heutigen organischen Chemie zu rektifizieren, anknüpfend an Produktionsfütterungen der Schafe. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1866, **8**, p. 320.
- [33] FANTO (R.) et NIKOLITSCH (W.), Zur Rohfaserbestimmung nach dem Weender-Verfahren. *Zeit. anal. Chemie*, 1915, **34**, p. 73, 76.
- [34] FORBES (E. B.) et MENSCHING (S. E.), An improved method of crude fiber estimation. *J. Ind. Eng. Chem.*, 1913, **5**, p. 258.
- [35] FUNK (C.), Dietary conditions in growth. *J. Biol. Chem.*, 1916, **27**, p. 1.
- [36] GAYON (U.), Recherches sur la fermentation du fumier. *C. R. Ac.*, 1884, **98**, p. 528.
- [37] GEPHART, cité par BOPST et BIDWELL, A study of the Gephart method for the determination of crude fiber. *J. Assoc. off. Agric. Chem.*, 1921-1922, **5**, p. 422.
- [37 bis] GODDEN (W.), The digestibility of straw after treatment with soda. *J. Ag. Science*, 1920, **10**, p. 437.
- [38] GOY (P.), Les végétaux inférieurs et les facteurs accessoires de la croissance. *C. R. Ac.*, 1921, **172**, p. 242.
— Les facteurs accessoires de la croissance chez les végétaux inférieurs (Bacilles. Saccharomyces. Mucorinées). Thèse de doctorat, *Faculté des Sciences de Paris*, 1921.
- Physiologie microbienne et facteur accessoire de la croissance. *C. R. Ac.*, **174**, 1922, p. 1579.
- Action de filtrat de *Mucor* sur le développement des cultures microbiennes. *C. R. Soc. Biologie*, 1922, **87**, p. 1007.
- [39] GRANDEAU (L.), *Analyse des matières agricoles*, 1897, **2**, p. 213.
- [40] GRANDEAU (L.) et ALEKAN (A.), Expériences sur l'alimentation du cheval de trait. *Ann. Sc. Agron.*, 1905, **2**, p. 138.

- [41] GRÉGOIRE (Ach.) et CARPIAUX (Em.), Appareil pour le dosage de la cellulose. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1910, **24**, p. 217.
- [42] GREIFENHAGEN (W.), Bestimmung der Rohfaser bei staubartig feinen Stoffen. *Zeit. Unter. Nahr. Genuss.*, 1912, **23**, p. 101.
- [43] GRIMMER (W.) et SCHEUNERT (A.), Ueber die Zelluloseverdauung bei den Haustieren. IV. Mitteilung. Ueber die Methode der quantitativen Zellulosebestimmung von Simon und Lohr. *Berl. tierärztl. Woch.*, 1910, **7**, p. 152.
- [44] GROENEWEGE (J.), Die Zersetzung der Zellulose durch aerobe Bakterien. *Mededeel. Geneesk. Laborat. Weltereden*, 1920, 3^e série A, p. 163.
- II. Ueber das Vorkommen von Emulsin in Bakterien, ein Beitrag zur Physiologie der zellulosezersetzenden Bakterien. *Mededeel. proefst. Landbouw*, 1921, n^o 8.
- III. Weitere Untersuchungen über den eigentlichen Aeroben sowie über den Denitrifikationsprozess. *Mededeel. proefst. Landbouw*, 1923, n^o 13.
- [45] GUIART (J.) et GRIMBERT (L.), *Diagnostic chimique, microscopique et parasitologique*, 4^e édition, p. 483. Lamarre, éditeur, Paris, 1922.
- [46] HAIGH (L. D.), A suggested modification of the method for crude fiber. *J. Ass. off. agric. Chem.*, 1920-1921, **4**, p. 336.
- [47] HARINGTON (Ch. R.), A note on the physiology of the Ship-worm (*Teredo norvegica*). *Bioch. Journ.*, 1921, **15**, p. 736.
- [48] HAUBNER. *J. f. Landwirt.*, 1855.
- [49] HAUBNER-SUSSDORF. *Chem. Ackersmann*, 1861.
- [50] HÉBERT (Alex.), Sur les fermentations du fumier. *C. R. Ac.*, 1892, **116**, p. 1321. *Ann. Agron.*, **18**, p. 536.
- [51] HELLRIEGEL et LUKANUS, Ueber den Nährwert des Brühhäcksels. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1865, **7**, p. 242.
- [52] HENNEBERG (W.), Neue Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer. I. Heft, 1870.
- [53] HENNEBERG (W.) et PREIFFER (Th.), Ueber den Einfluss eines einseitig gesteigerten Zusatzes von Eiweißstoffen zum Beharrungsfutter auf den Gesamtstoffwechsel des ausgewachsenen Thieres. *J. f. Landw.*, 1890, 38^e année, p. 215.
- [54] HENNEBERG (W.) et STOHMANN. *J. f. Landw.*, 1859, p. 361 : Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer. I. Heft, 1860 ; II. Heft, 1864.
- [55] HOFMEISTER (W.), Die Rohfaser und einige Formen der Cellulose. *Landw. Jahrb.*, 1888, **17**, p. 329.
- Die Cellulose und ihre Formen. *Landw. Jahrb.*, 1889, **18**, p. 767.
- [56] HOFMEISTER (V.), Fütterungsversuche mit Schafen. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1864, **6**, p. 185, p. 301, 397.
- [57] HOFMEISTER (V.), Verdaut das Pferd Pflanzenfaser? *Landw. Versuchs-Stat.*, 1865, **7**, p. 413.
- [58] HOFMEISTER, Fütterungsversuch mit Merinos- und Southdown-Frankenhämmeln. *Landw. Versuchs-Stat.*, **8**, p. 351.
- [59] HOFMEISTER, Fütterungsversuche mit Schafen. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1869, **11**, p. 241.
- [60] HOFMEISTER, Ueber Celluloseverdauung. *Archiv f. wiss. u. prakt. Tierh.*, 1881, **7**, p. 169.
- [60] HOFMEISTER, Ueber Celluloseverdauung beim Pferde. *Archiv f. wissensch. u. prakt. Tierh.*, 1885, **11**, p. 46.
- [61] HOLDFLEISS, Eine abgekürzte Methode der Rohfaserbestimmung. *Landw. Jahrb.*, Suppl., **1**, 1877, p. 103.
- [62] HOLDFLEISS, Die Bedeutung des verdauten Anteils der Rohfaser für die tierische Ernährung. *Berichte a. d. phys. Labor. v. d. Versuchs-Station des landw. Inst. d. Univ. Halle*, Heft 12, p. 52. *C. f. Agr. Chemie*, 1896, **25**, p. 372.
- [63] HOLLDAK (H.), Ueber Beschleunigung des Weender-Verfahrens der Rohfaserbestimmung. *Chem. Zeit.*, 1903, **27**, p. 1034.
- [64] HOPPE-SEYLER (F.), Gährung der Cellulose. *Ber. d. deut. chem. Gesell.*, 1883 (1), **16**, p. 122.
- [64] HOPPE-SEYLER (F.), Ueber Gährung der Cellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure. *Zeit. f. phys. Chemie*, 1886, **10**, p. 201.

- [64 bis] HOPPE-SEYLER, Ueber Huminsubstanzen, ihre Entstehung und ihre Eigenschaften. *Zeit. f. phys. Chem.*, 1889, **13**, p. 66.
- [65] HOPPE (A.), Bakteriologische Untersuchungen über die Zelluloseverdauung. *C. f. Bakt.*, Abt. I, Orig., 1919, **83**, p. 374.
- [66] HÖSSLIN (A.), Zur Kenntniss der Zelluloseverdauung. Die Ausnutzung der Zellulose beim Hund. *Zeit. f. Biol.*, 1910, **54**, p. 395.
- [67] HÖSSLIN (A.) et LESSER, Ueber die Zersetzung der Zellulose durch den Inhalt des Cæcums des Pferdes. *Zeit. f. Biol.*, 1910, **54**, p. 47.
- [68] HUTCHINSON (H. B.) et CLAYTON (J.), On the decomposition of cellulose by an aerobie organism (*Spirocheata cytophaga*, n. sp.). *J. Agric. Science*, 1919, **9**, p. 143.
- [69] ITERSON van (G.), Die Zersetzung von Zellulose durch aerobe Mikroorganismen. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1904, **11**, p. 689.
- [70] IWANOWSKI (W.), Ueber eine Vorrichtung für umgekehrte Filtration und deren Anwendung in der Weender-Rohfaserbestimmung. *J. f. Landw.*, 1909, **57**, p. 1.
- [71] KALNING (H.), Eine beschleunigte Rohfaserbestimmung. *Zeit. ges. Getreidewesen*, 1913, **5**, p. 6.
- [72] KELLERMANN (K. F.), Formation of cytase by *Penicillium Pinophilum*. *U. S. Dept. Agr. Bur. Plant Industr. Circ.*, **113**, 1912, p. 29.
- [73] KELLERMANN (K.) et MAC BETH (I. G.), The fermentation of cellulose. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1912, **34**, p. 485.
- [74] KELLERMANN (K.), MAC BETH (I. G.), SCALES et SMITH, Identification and classification of cellulose-dissolving Bacteria. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1913-1914, **39**, p. 502.
- [75] KELLNER (O.) et KOHLER (A.), Untersuchungen über den Stoff- und Energieumsatz des erwachsenen Rindes bei Erhaltungs- und Produktionsfutter. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1900, **53**, p. 1.
- [76] KERN, Zur Bestimmung der Cellulose. *J. f. Landwirt.*, 1876, **24**, p. 19.
- [77] KNAUTHE, Untersuchungen über Verdauung u. Stoffwechsel bei Fischen. *Zeit. f. Fischerei*, 1897, 5^e année.
- [78] KNAUTHE et ZUNTZ, Ueber die Verdauung u. den Stoffwechsel der Fische. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1898, p. 149.
- [79] KNIRIEM von (W.), Ueber die Verwerthung der Cellulose im thierischen Organismus. *Zeit. f. Biol.*, 1885, **21**, p. 67.
- [80] KNIRIEM von (W.), Ueber die eiweissparende Wirkung der Cellulose bei Ernährung der Herbivoren. *Entgegnung, Zeit. f. Biol.*, 1888, **24**, p. 293.
- [81] KÖNIG (J.), Ueber die Bestimmung der Cellulose. *C. f. Agr. Chem.*, 1874, **5**, p. 346.
- [81] KÖNIG (J.), Zur Bestimmung der Cellulose. *C. f. Agr. Chem.*, 1877, **11**, p. 41.
- [82] KÖNIG (J.), Bestimmung der Zellulose, des Lignins und Kutins in der Rohfaser. *Zeit. f. Unters. Nahr. Genuss.*, 1906 (2), **12**, p. 385.
- [83] KOSIN (N. I.), Ueber aerobe Zersetzung von Zellulose durch Schimmelpilze. *Chem. Zentr.*, 1922, **15**, p. 874. *Nach. d. Phys. Chem. Lomonossow. Ges.*, Moscou, 1921, **2**, p. 57.
- [84] KRESS (O.), Wood and wood-pulp infection and decay. *Pulp and Paper, Mag. Can.*, 1920, **18**, p. 1225.
- [85] KROULIK (A.), Ueber thermophile Zellulosevergären. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1913, **36**, p. 339.
- [86] KUHN ARONSTEIN et SCHULZE (H.), Berichte über die auf der landwirtschaftlichen Versuchsstation Weende ausgeführten Versuche. *J. f. Landw.*, 1866, 14^e année.
- [87] KUHN et FLEISCHER, Versuche über die Ausnutzung des blühenden Rothklee's als Grünfutter und als Heu, ausgeführt an der *Landw. Versuchs-Stat.*, 1869, **11**, p. 177.
- [88] KUHN FLEISCHER et STRIEDTER, Fütterungsversuche mit Grünklee. *J. f. Landw.*, 1869, 17^e année.
- [89] LANGE (G.), Zur quantitativen Bestimmung der Cellulose. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1890, **14**, p. 283.
- [90] LEGOCQ (R.), Les troubles de croissance considérés comme maladies par carence physique. *Bull. Sc. Pharm.*, 1922, **29**, p. 132.

- [91] LEHMANN (Fr.), Versuche über die Bedeutung der Cellulose als Nährstoff. *J. f. Landw.*, 1889, 17^e année, p. 261.
- [92] LEHMANN (K. B.), *Die Methoden der praktischen Hygiene*, 1901, Wiesbaden.
- [93] LEHMANN (Fr.) et VOGEL (F. H.), Ueber die Verdaulichkeit von Wiesenheu, Bohnenschrot, Gerstenschrot, Stückrüben und Reisfuttermehl. *J. f. Landw.*, 1890, 38^e année, p. 165.
- [94] LINDET (L.), Sur le dosage de la cellulose dans les farines en vue de la recherche de leur degré de blutage. *Bull. Soc. Chim.*, 1914, 15, p. 384.
- [95] LOHNIS et LOCHHEAD, Ueber Zellulosezersetzung. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1913, 37, p. 490.
- [96] LOHRISCH (H.), Ueber die Bedeutung der Zellulose im Haushalte des Menschen. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1906, 47, p. 200.
- [97] LOHRISCH (H.), Ueber die Verdauung und Verwertung der Rohfaser und Zellulose im tierischen und menschlichen Organismus. *Zent. f. die ges. Phys. u. Path. des Stoffw.*, 1907, p. 801.
- [98] LOHRISCH (H.), Der Vorgang der Zellulose- und Hemizelluloseverdauung beim Menschen und der Nährwert dieser Substanzen für den menschlichen Organismus. *Zeit. f. exp. Path. u. Ther.*, 1908, 5, p. 478.
- [99] LOHRISCH, Bemerkungen zur Frage der Zelluloseverdauung beim Hunde und über die Methoden der quantitativen Zellulosebestimmung. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1910, 69, p. 143.
- [100] MACH (F.) et LEDERLE (P.), Ein Mittel zum raschen Filtrieren bei Rohfaser- und anderen Bestimmungen-Verbesserung der Witt'schen Siebplatte. *Chem. Ztg.*, 1919, 43, p. 261.
- [101] MALLÈVRE, Der Einfluss der als Gärungsprodukte der cellulosegebildeten Essigsäure auf den Gaswechsel. *Archiv f. ges. Phys.*, 1891, 49, p. 460.
- [102] MANN, Zur Zellulosebestimmung im Kothe. *Archiv f. Hyg.*, 1899, 36, p. 158.
- [103] MAZÉ (P.), Ferment forménique. Fermentation forménique de l'acétone. Procédé de culture simple du ferment forménique. *C. R. Soc. Biol.*, 1915, 78, p. 398.
- [104] MC BETH (I. G.), Cellulose as a source of energy for nitrogen fixation. *U. S. Dept. Agr. Bur. Plant. Ind. Circ.*, 131, 1913, p. 25.
- [105] MC BETH [I. G.], On the decomposition of cellulose in soils. *Soil Science*, 1916, 1, p. 436.
- [106] MC BETH et SCALES, The destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi. *U. S. Dept. Agr. Bur. Plant Ind. Bull.*, 266, 1913.
- [107] MC BETH, SCALES et SMITH. *Science*, 1913, 38, p. 445.
- [108] MC FAYEN (A.) et BLAXALL (F. R.), Thermophilic Bacteria. *Tr. of Jenner Inst. Prev. Med.*, 1899, p. 162.
- [109] MC GILLAVRY, Sur la digestion artificielle de la cellulose. *Arch. néerl.*, 1876, 4^{re} série, 11, p. 394.
- [110] MERKER (E.), Parasitische Bakterien auf Blättern von Elodea. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1912, 31, p. 578.
- [111] METCHNIKOFF et BERTHELOT, Roussettes et microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, 23, p. 937.
- [112] MÉTHODE OFFICIELLE AMÉRICAINE. *J. Ass. off. Agr. Chem.*, 1916, 2, p. 118.
- [113] MITSCHERLICH, Ueber die Zusammensetzung der Wand der Pflanzen. *Ann. Chem. u. Pharm.*, 1850, 75, p. 305.
- [114] MÜLLER (E.), Ein Beitrag zur Frage der Zelluloseverdauung im Darmcanale. *Archiv f. ges. Phys.*, 1901, 83, p. 619.
- [115] MUNTZ (A.), Recherches sur la digestion des fourrages employés dans l'alimentation des chevaux. *Ann. Inst. agron.*, 1879-1880, 5, p. 195.
- [116] MUNTZ (A.) et GIRARD (Ch.), Recherches sur la valeur alimentaire du foin. *Ann. Inst. agron.*, 1879-1880, p. 229.
- [117] MUNTZ (A.) et GIRARD (Ch.), Recherches sur la valeur alimentaire de l'avoine. *Ann. Inst. agron.*, 1882-1883, 8, p. 161.
- [118] MUNTZ (A.) et GIRARD (Ch.), Recherches sur la digestion des fourrages. *Ann. Inst. agron.*, 1882-1883, 8, p. 183.
- [119] MUNTZ (A.) et GIRARD (Ch.), Recherches sur la valeur alimentaire de l'orge. *Ann. Inst. agron.*, 1883-1884, 9, p. 91.

- [419] MUTTEBLEIN (C.), Studien über die Zersetzung der Zellulose im Dünger und Boden. Dissert. Leipzig, 1913. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1913-1914, **39**, p. 107.
- [420] NIDER (G. M.), The determination of crude fiber. *J. of Ind. and Eng. Chem.*, 1910, **2**, p. 251.
- [421] NOLTE (O.), Zur Bestimmung der Rohfaser. *Zeit. analyt. Chem.*, 1919, **58**, p. 392.
- [421] NOLTE (O.), Untersuchungen über die Bestimmung der Rohfaser. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1920, **96**, p. 325.
- [422] OSBORNE (Th. B.) et MENDEL (L. B.), The growth of chickens in confinement. *J. Biol. Chem.*, 1918, **33**, p. 433.
- [423] OMELIANSKY (V.), Sur la fermentation de la cellulose. *C. R. Ac.*, 1895, **121**, p. 653.
- Sur un ferment de la cellulose. *C. R. Ac.*, 1897, **125**, p. 970.
- Sur la fermentation cellulosique. *C. R. Ac.*, 1897, **125**, p. 1131. *Arch. des Sciences biol.*, Petrograd, 1899, **7**, p. 411; 1902, **9**, p. 261.
- Ueber die Zellulosegärung. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1902, **18**, pp. 193, 225, 257, 283, 321, 355.
- Ueber die Trennung der Wasserstoff- und Methan-Gärung der Zellulose. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1903-1904, **11**, p. 703.
- Die histologischen und chemischen Veränderungen der Leinstengel unter Einwirkung der Mikroben der Pektin- und Zellulosegärung. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1904, **12**, p. 33.
- [424] OMELIANSKY (V.), Zur Frage der Zellulosegärung. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1913, **36**, p. 472.
- [425] PACAUT (H.) et VIGIER, Les glandes salivaires de l'escargot. *Archives d'anatomie microscopique*, 1905-1906, **8**, p. 425.
- [426] PÉNAU (H.) et SIMONNET (M.), Régimes simples carencés en facteur liposoluble A. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, **6**, p. 192.
- [427] PREIFFER et LEHMANN, Fütterungsversuche mit Hammeln an der Versuchsstation Göttingen, 1885.
- Vergleichende Versuche über die Verdaulichkeit von frischen und getrockneten Schnitzeln. *J. f. Landw.*, 1885, 33^e année, p. 337.
- [428] PICKELL (J. M.), A rapid method of determining crude fiber. *J. Ind. and Eng. Chem.*, 1910, **2**, p. 280.
- [429] POPOFF (L.), Ueber die Sumpfgasgärung. *Archiv f. ges. Phys.*, 1875, **10**, p. 413.
- [430] PRAZMOWSKI (A.), Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien. Arten. Leipzig, 1880, 58 p.
- [431] PRINGSHEIM (H.), Ueber fermentativen Abbau der Zellulose. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1912, **78**, p. 266.
- [432] PRINGSHEIM (H.), Ueber die Vergärung der Zellulose durch thermophile Bakterien. *C. f. Bakt.*, Abt. II, 1913, **38**, p. 513.
- [432] PRINGSHEIM (H.), Die Beziehungen der Zellulosezersetzung zum Stickstoffgehalt in der Natur. *Mitt. Deut. landw. Ges.*, 1913, **28**, pp. 26, 43, 295.
- [433] ROMANOWSKY. *Précis de microscopie*. Langeron. Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris.
- [434] RUBNER (M.), Die Zusammensetzung des Birkenholzes. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1915, p. 71.
- Untersuchungen über die Resorbierbarkeit des Birkenholzes. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1915, p. 83.
- Ueber die Ausnutzbarkeit der Zellmembranen der Kleie. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1915, p. 135.
- Ueber die Verdaulichkeit der Zellmembranen des Spinates. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1915, p. 257.
- Ueber die Verdaulichkeit der Zellmembranen der gelben Rüben. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1915, p. 265.
- Die Verdaulichkeit der Haselnusskerne. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1915, p. 272.
- Versuche über die Verdaulichkeit der Haselnusschalen. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1915, p. 281.

— Die Zusammensetzung der Steinpilze und ihre Verdaulichkeit. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1915, p. 286.

— Die Verdaulichkeit des durch Säuren aufgeschlossenen Holzmehles von Koniferen. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 40.

— Die Verdaulichkeit von Weizenbrot. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 61.

— Die Verdaulichkeit von Spelzmehl beim Hunde. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 93.

RUBNER (M.) et KOHRAUSCH, Die Verdaulichkeit des Spelzmehles beim Menschen. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 101.

RUBNER (M.), Ueber die Zusammensetzung und Verdaulichkeit der Keime einiger Zerealien. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 123.

— Die Verdaulichkeit von Spinat beim Säugling. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 132.

— Darstellung verwertbarer Nährstoffe in trockener Form aus Gemüsen. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 148.

— Die Verdaulichkeit reiner Zellulose beim Hunde. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 159.

RUBNER (M.) et THOMAS (K.), Die Verdaulichkeit des Roggens bei verschiedener Vermahlung. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 165.

RUBNER (M.), Die Verdaulichkeit der Mohrrüben beim Menschen. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 212.

— Ueber die Verdaulichkeit des Wirsingkohles. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 221.

— Die Verdaulichkeit der Kohlrüben beim Menschen. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 227.

— Ueber die Verdaulichkeit der Erdbeeren und der Äpfel beim Menschen. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 237.

— Ueber die Gerste als Nährmaterial. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1916, p. 339.

— Weitere Untersuchungen zur Verdaulichkeit des mit Säuren aufgeschlossenen Holzmehles. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1917, p. 20.

— Nährwert des durch Alkali aufgeschlossenen Strohes beim Hunde. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1917, p. 50.

— Die Verwertung aufgeschlossenen Strohes für die Ernährung des Menschen. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1917, p. 74.

— Untersuchungen über Volkornbrote. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1917, p. 245.

— Die Verdaulichkeit der Vegetabilien. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1918, p. 53.

[135] SCAKS (F. M.), Some filamentous fungi tested for cellulose destroying power. *Botan. Gaz.*, 1915, 60, p. 149.

[136] SCHEUNERT (A.), Beiträge zur Kenntnis der Zelluloseverdauung im Blinddarm und des Enzymgehaltes des Cäcalsekretes. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1906, 48, p. 9.

[137] SCHEUNERT (A.), Ueber die Zelluloseverdauung bei den Haustieren. III. Mitteilung. Vermag Schafspeichel Zellulose zu lösen? *Berl. tierärztl. Woch.*, 1910, n° 5, p. 113.

[138] SCHEUNERT (A.) et GRIMMER (W.), Zur Kenntnis der in den Nahrungsmitteln enthaltenen Enzyme und ihrer Mitwirkung bei der Verdauung. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1906, 48, p. 27.

[139] SCHEUNERT (A.) et LOETSCH (E.), Ueber die Zelluloseverdauung bei den Haustieren. II. Mitteilung. Vermag der Hund Zellulose zu verdauen? *Berl. tierärztl. Woch.*, 1909, n° 47, p. 867.

[139] SCHEUNERT (A.) et LOETSCH (E.), Vermag der Hund Zellulose oder Rohfaser zu verdauen? *Biochem. Zeit.*, 1909, 20, p. 10.

[140] SCHEUNERT (A.) et LOETSCH (E.), Ueber die quantitative Zellulosebestimmung mit Hilfe der Methode von Lange und Simon und Lohrlich. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1910, 65, p. 219.

[141] SCHLOESING (Th.) fils, Sur la combustion de certaines matières organiques. *C. R. Ac.*, 1889, **108**, p. 627.

[142] SCHLOESING (Th.) père, Sur la fermentation forménique du fumier. *C. R. Ac.*, 1889, **109**, p. 835.

[143] SCHMIDT et LOHRISCH, Ueber die Bedeutung der Zellulose für den Kraftwechsel der Diabetiker. *Deut. med. Woch.*, 1907, n° 47, p. 1938.

[144] SCHROEDER (J.), Ueber eine Vorrichtung für umgekehrte Filtration und deren Anwendung in der Weender-Rohfaserbestimmung. *J. f. Landw.*, 1909, **57**, p. 1; 1911, **59**, p. 105.

[145] SCHULZE (F.), Beitrag zur Kenntnis des Lignins. *Chem. Zentr.*, 1887, p. 321.

[146] SIMON (O.) et LOHRISCH (H.), Eine neue Methode der quantitativen Zellulosebestimmung in Nahrungsmittel und Fæces. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1904, **42**, p. 55.

[147] SPEARS (H. D.), A convenient and efficient digestion apparatus for the determination of crude fiber. *J. Ind. Eng. Chem.*, 1919, **11**, p. 140.

[148] SÉE (P.), La florule du papier. Etude systématique et biologique des champignons chromogènes du papier piqué. (Nature, origine, agents et remèdes de l'altération des papiers.) *Thèse Paris*, 1919.

[149] SEILLIÈRE (G.), Sur un cas d'hydrolyse diastasique de la cellulose du coton, après dissolution dans la liqueur de Schweitzer. *C. R. Soc. Biol.*, 1906, **61**, p. 205.

— Remarques sur l'hydrolyse diastasique de la cellulose du coton et de quelques autres polysaccharides. *C. R. Soc. Biol.*, 1907, **63**, p. 515.

— Sur la digestion de la cellulose. *C. R. Soc. Biol.*, 1910, **68**, p. 107.

[150] SENUS van (A. C. H.). *Bijdrage tot de Kennis der Cellulosegisting*, Leyden, 1890.

[151] STIFT. *Oester. Zeit. f. Zuckerindustrie*, 1896.

[152] STOHMANN, Ueber die Ernährungsvorgänge des Milch produzierenden Tieres. *Zeit. f. Biol.*, 1870, **6**, p. 205.

[153] SWEENEY (O.). *U. S. Dep. Agr. Bur. Chem. Bull.*, 137, p. 157.

Cité par C. Kennedy, A modification of the sweeney method for crude fiber. *J. Ind. Eng. Chem.*, 1912, **4**, p. 600.

[154] SY (A. P.), Arrangement for preventing frothing in crude fiber determination. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1908, **30**, p. 1792.

[155] TAPPEINER (H.), Die Darmgase der Pflanzenfresser. *Ber. d. deut. chem. Ges.*, 1881 (3), **14**, p. 2375.

— Ueber Cellulosegährungen. *Ber. d. deut. chem. Ges.*, 1882 (1), **15**, p. 999; 1883 (2), **16**, p. 1734.

— Die Gase des Verdauungschlauches der Pflanzenfresser. *Zeit. f. Biol.*, 1883, **119**, p. 228.

— Ueber die Gährung der Cellulose, insbesondere über deren Lösung im Darmkanale. *Zeit. f. Biol.*, 1884, **20**, p. 52.

— Nachträge zu den Untersuchungen über die Gährung der Cellulose. *Zeit. f. Biol.*, 1888, **24**, p. 105.

[156] THOMAS et PRINGSHEIM, Die Verdaulichkeit der Zellulose. *Archiv f. Anat. u. Phys., Phys. Abt.*, 1918, p. 25.

[157] TRECU (A.), Matière amylacée et cryptogames amylières dans les vaisseaux du latex de plusieurs Apocynées. *C. R. Ac.*, 1865, **61**, p. 156.

— Production de plantules amylières dans les cellules végétales pendant la putréfaction. *C. R. Ac.*, 1865, **61**, 432.

— Réponse à trois notes de M. Nylander concernant la nature des amylobacter. *C. R. Ac.*, 1867, **65**, p. 513.

[158] VANDEVELDE (A. J. J.), Sur le résidu insoluble cellulosique. *Bull. Soc. chim. Belg.*, 1920, **29**, p. 258.

[159] VAN TIEGHEM, Sur la fermentation de la cellulose. *C. R. Ac.*, 1879, **88**, p. 205.

— Identité du *Bacillus amylobacter* et du vibron butyrique de M. Pasteur. *C. R. Ac.*, 1879, **89**, p. 5.

— Sur la fermentation butyrique (*Bacillus amylobacter*) à l'époque de la houille. *C. R. Ac.*, 1879, **89**, p. 1102.

- [160] VEILLON (R.), Sur quelques microbes thermophiles strictement anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur*, 1922, **36**, p. 422.
- [161] VOIT et HOFFMANN, cité par TAPPEINER [155], Sitzungsberichte der bayerischen Akademie, 1869.
- [162] WAENTIG (P.), Nochmals die tierische Rohfaserverdauung. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1919, **107**, p. 225.
- [163] WAENTIG (P.) et GIERISCH (W.), Ueber ein einfaches Verfahren, die Verdaulichkeit des Zelluloseanteils von Pflanzenfaser, insbesondere von Holzfaser, schätzungsweise zu bestimmen. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1918, **103**, p. 87.
- Ueber Zelluloseverdauung *in vitro* zum Zwecke der Feststellung der Verdaulichkeit zellulosehaltiger Futtermittel. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1917, **107**, p. 203.
- [164] WATTENBERG, Eine vereinfachte Methode der Weender-Rohfaserbestimmung. *J. f. Landw.*, 1880, p. 273.
- [165] WEHMER, Zum Abbau der Holzsubstanz durch Pilze. *Ber. d. d. chem. Ges.*, 1915, **48**, p. 130.
- [166] WEILL (E.) et MOURIQUAND (G.), Les maladies par carence, carence expérimentale. *Revue de Médecine*, 1916, p. 1.
- [167] WEISKE (H.), Untersuchungen über die Verdaulichkeit der Cellulose beim Menschen. *Zeit. f. Biol.*, 1870, **6**, p. 456.
- [168] WEISKE (H.), Ueber die Verdaulichkeit der Cellulose beim Schwein. *Landw. Versuchs Stat.*, 1872, **15**, p. 90.
- [169] WEISKE (H.), Versuche über etwaige Einflüsse, welche die Aufnahme freier Säure auf die Verdauungsvorgänge sowie auf den Stickstoff- und Mineralstoffumsatz im Körper der Herbivoren ausübt. *J. f. Landw.*, 1886, 33^e année, p. 21.
- [170] WEISKE (H.), Zur Frage über den Einfluss einmaliger oder fraktionierter Aufnahme der Nahrung auf die Ausnutzung derselben. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1894, **18**, p. 109.
- [171] WEISKE (H.) et FLEISCHIG (F.), Ueber die Ausnutzung gleicher Quantitäten ein und desselben Futters durch Herbivoren, je nach Verabreichung desselben in einer oder mehreren Portionen. *J. f. Landw.*, 1884, 32^e année, p. 337.
- [172] WEISKE (K.) et FLEISCHIG (F.), Kommt den in pflanzlichen Futtermitteln enthaltenen organischen Säuren eine den Kohlehydraten ähnliche eiweissparende Wirkung zu? *J. f. Landw.*, 1889, 37^e année, p. 199.
- [173] WEISKE, KENNEDY und SCHULZE, Beiträge zur Frage über das Futterverwertungsvermögen verschiedener Schafrassen. *C. f. Agr. Chem.*, 1882, 11^e année.
- [174] WEISKE et MERLIS, Ueber das Verhalten der Rohfaser im Verdauungsapparate der Gänse. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1878, **21**, p. 411.
- [175] WEISKE, SCHULZE (B.) et FLEISCHIG, Kommt der Cellulose eiweissparende Wirkung bei der Ernährung der Herbivoren zu? *Zeit. f. Biol.*, 1888, **24**, p. 553.
- [176] WICKE (H.), Die Dekortikation des Getreides und ihre hygienische Bedeutung. *Archiv f. Hyg.*, 1890, **11**, 335.
- [177] WICKE (H.) et WEISKE (H.), Ueber den Einfluss einer Fett-, resp. Stärkebeigabe auf die Ausnutzung der Nährstoffe, sowie auf den Stickstoffumsatz und Ansatz im tierischen Organismus. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1895-96, **21**, p. 42.
- [178] WILSING, Ueber die Mengen der vom Wiederkäuer in den Entleerungen ausgeschiedenen flüchtigen Säuren. *Zeit. f. Biol.*, 1885, **21**, p. 625.
- [179] WOLFF, FUNKE et KELLNER, Untersuchungen über die Zusammensetzung und Verdaulichkeit, der sorgfältig getrockneten und der auf dem Felde in Dürre umgewandelten Luzerne. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1878, **21**.

ANON. *J. Board Agr.*, 1919, **25**, p. 15.

BECKMANN. *Z. angew. Chem.*, 1919, **32** (1), p. 81.

BECKMANN. *Fest. Kais. W. Ges. Förd. Wiss. zehnj. Jubil.* 1921, p. 18.

BRAHM, VON DER HEIDE et ZUNTZ. *Mitt. deut. Landw.-Gesell.*, 1915, n^o 46.

- DARMFELT. *Kungl. Central. försöks. jordbr. smonradi*, 1919, **168**.
EDIN, *Meddel. Central. försöks. jordbr. somradi*, 1919, **168**.
ELLENBERGER et WAENTIG. *Deut. landw. Presse*, 1917, **44**, pp. 335, 343, 558; 1918, **45**, p. 195 *bis*.
FINGERLING. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1918, 1919, **92**, p. 1.
HONCAMP et BLANCK. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1919, **93**, p. 175.
HONCAMP et BAUMANN. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1921, **98**, pp. 1, 43.
HONCAMP, NOLTE et POMMER. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1921, **98**, 249.
HAUSEN. *Deut. landw. Gesell.*, 1917, **32**, p. 712 *bis*.
HAUSEN. *Deut. landw. Tierzucht*, 1917, **21**, p. 67 *bis*.
JONSCHER. *Z. öffentl. Chem.*, 1918, **24**, p. 279.
KAMPEN (van). *Chem. Weekblad.*, 1919, **16**, p. 805.
KELLNER et KOHLER. *Deut. landw. Presse*, 30^e année, n^o 45, p. 397.
MORGEN, BERGEN, WAGNER, SCHOLER, OHLMER et PLAUT. *Landw. Versuchs-Stat.* 1918, **92**, p. 57.
PRINGSHEIM. *Z. angew. Chemie*, 1919, **32** (I), p. 249.
SCHWALBE. *Papier Zeit.*, 1918, **43**, p. 318.
STUTZER. *Landw. Versuchs-St.*, 1915, p. 228.
TOLLENS. *J. f. Landw.*, 1917, **65**, p. 219.
WEISER et ZAITSCHEK. *Landw. Versuchs-Stat.*, 1921, **97**, p. 57.
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTE

Géologie. — Le pays de Bray.

Botanique. — Composition et rôle physiologique des résines.

Vu et approuvé :

Paris, le 20 avril 1923.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. MOLLIARD.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

P. APPELL.

TABLE DES MATIÈRES

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE DE LA DIGESTION DE LA CELLULOSE

INTRODUCTION	5
CHAPITRE I. — Méthodes de dosage de la cellulose.	7
A. Méthodes de dosage de la cellulose brute.	7
B. Méthodes de dosage de la cellulose pure.	13
CHAPITRE II. — Essais de digestion.	18
A. Essais de digestion faits sur l'homme	18
B. Essais de digestion faits sur les animaux.	24
a) Essais sur les herbivores	24
b) Essais sur les carnivores.	28
CHAPITRE III. — Facteurs influant sur la digestion de la cellulose. .	30
1° L'âge des animaux	30
2° La race des animaux	30
3° L'état des aliments.	30
4° La quantité de cellulose donnée.	31
5° Les aliments ajoutés	32
CHAPITRE IV. — Valeur nutritive de la cellulose	33
CHAPITRE V. — Agent de dissolution de la cellulose	35
A. Recherches sur la cellulase du tube digestif des animaux supérieurs	35
B. Recherches sur la cellulase du tube digestif des animaux inférieurs.	38
C. Influence sur la digestion de la cellulase contenue dans les aliments	39
D. Rôle des micro-organismes dans la digestion de la cellulose. .	40

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DU *BACILLUS CELLULOSÆ DISSOLVENS*

CHAPITRE I. — Essais d'isolement.	55
A. Milieux liquides	55
B. Milieux solides.	57
CHAPITRE II. — Caractères du <i>Bacillus cellulosæ dissolvens</i>	64
A. Morphologie	64
B. Conditions de culture.	65
a) Influence du nombre de microbes ensemencés	66
b) Influence de l'oxygène.	67
c) Influence de la température.	71
d) Influence de la réaction du milieu	71
e) Influence de la composition du milieu de culture. Compo- sition de l'extrait de matières fécales	73
f) Action de l'eau.	80
C. Action du <i>Bacillus cellulosæ dissolvens</i> sur les hydrates de carbone.	80
D. Recherche d'une cellulase.	81
E. Pouvoir pathogène	83
CHAPITRE III. — Caractérisation et dosage des produits de décom- position de la cellulose par le <i>Bacillus cellulosæ dissolvens</i> . .	84
Première analyse	85
Deuxième analyse.	88
Recherche de l'acide lactique.	92
Recherche des produits d'hydrolyse de la cellulose	92
Réactions de la solution alcoolique de pigment	93
Détermination de la nature des corps volatils en milieu neutre .	93
Détermination de la nature et dosage des corps volatils en milieu acide.	94
CONCLUSIONS.	97
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	99

